

**ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΕΛΩΔΙΜΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΓΕΩΡΓΙΑ ΚΟΤΑΝΙΔΟΥ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Ιούνιος 2024

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ
ΕΔΩΔΙΜΩΝ MEMBRANΩΝ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Αικατερίνη Παπαδάκη, Επ. Καθηγήτρια

Νικόλαος Κοψαχείλης, Αν. Καθηγητής

Μαρία Αλεξανδρή, Επ. Καθηγήτρια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το τυρόγαλα είναι υποπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής τυριού που συνήθως απορρίπτεται στο περιβάλλον προκαλώντας προβλήματα. Λόγω του μεγάλου όγκου τυρογάλακτος που παράγεται παγκοσμίως, το τυρόγαλα θεωρείται σημαντικός ρύπος, ενώ η πιθανή αξιοποίησή του μπορεί να συμβάλει στην απαλλαγή του οικοσυστήματος από ένα ακόμη απόβλητο υψηλού ρυπαντικού φορτίου, και παράλληλα να συμβάλει στην ανάπτυξη νέων προϊόντων τροφίμων. Στην παρούσα μελέτη προτείνεται η πλήρης αξιοποίηση του τυρογάλακτος για παραγωγή καινοτόμων βιολειτουργικών εδωδιμων μεμβρανών από πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Η λακτόζη τυρογάλακτος χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή κυτταρικής μάζας του γαλακτικού βακτηρίου *Lactiplantibacillus plantarum* (F_254), ενώ η συμπυκνωμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα παραγωγής εδωδιμων μεμβρανών. Οι μεμβράνες αυτές μελετήθηκαν ως φορείς ενθυλάκωσης της λυοφιλιωμένης καλλιέργειας του *L. plantarum* και η επίδρασή τους στη διατήρηση της βιωσιμότητάς του σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης (5°C και 25°C) για 90 ημέρες. Παράλληλα μελετήθηκε και η διαφοροποίηση της μήτρας ενθυλάκωσης με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων βακτηριακής ναοκυτταρίνης (BCNW 0%, 5%, 10%), καθώς και η επίδραση αυτής στη βιωσιμότητα του στελέχους. Αρχικά μελετήθηκαν οι φυσικές ιδιότητες των εδωδιμων μεμβρανών, ενώ μεγαλύτερη έμφαση δόθηκε στην μελέτη της βιωσιμότητας του στελέχους μετά από εγκλωβισμό σε μεμβράνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, μεταξύ των διαφορετικών κρυοπροστατευτικών υλικών, το αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα κρίθηκε ως το καταλληλότερο για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του F_254 κατά τη λυοφιλίωση. Ο εγκλωβισμός των λυοφιλιωμένων κυττάρων σε εδωδιμες μεμβράνες φάνηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικός. Ειδικότερα, τα μη εγκλωβισμένα (ελεύθερα) λυοφιλιωμένα κύτταρα παρουσίασαν μείωση της βιωσιμότητας κατά 74% σε θερμοκρασία 5 °C μετά από 90 ημέρες, ενώ στις αντίστοιχες συνθήκες αποθήκευσης, τα βέλτιστα αποτελέσματα προέκυψαν από τις μεμβράνες με συγκέντρωση BCNW 5% και 10% όπου το στέλεχος εμφάνισε ποσοστό βιωσιμότητας 83% (9,2 Log CFU/g). Εμφανής ήταν και η επίδραση της BCNW, καθώς σε ίδιες συνθήκες αλλά απουσία BCNW βιωσιμότητα ήταν 73% (8 Log CFU/g). Η διατήρηση της βιωσιμότητας φάνηκε να είναι αποτέλεσμα τόσο της θερμοκρασίας αποθήκευσης όσο και της παρουσίας της BCNW. Πιο συγκεκριμένα, στους 25 °C η βιωσιμότητα ήταν

65% για τις μεμβράνες που περιείχαν BCNW 5% και 61% για εκείνες στις οποίες δεν έγινε προσθήκη BCNW. Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα απελευθέρωσης του γαλακτικού βακτηρίου από τις εδώδιμες μεμβράνες χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά διαλύματα προσομοίωσης τροφίμων. Η μελέτη απελευθέρωσης του γαλακτικού βακτηρίου σε διαλύματα προσομοίωσης τροφίμων έδειξε ότι το υψηλότερο ποσοστό απελευθέρωσης παρατηρούνταν στις μεμβράνες που περιείχαν BCNW. Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι εδώδιμες μεμβράνες μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στη διατήρηση της βιωσιμότητας του συγκεκριμένου στελέχους, ενώ καθοριστικό φαίνεται ότι έχουν τα χρησιμοποιούμενα υλικά (BCNW) στη μήτρα εγκλωβισμού αλλά και οι συνθήκες αποθήκευσης.

ABSTRACT

Cheese whey, a by-product of the cheese production industry, usually ends up in the environment, causing adverse effects. Due to the large volume of cheese whey produced worldwide, it is considered a significant pollutant. However, its potential utilization can help reduce this environmental burden and contribute to the development of new food products. In the present work, the valorization of cheese whey for the production of innovative functional edible films is proposed. Cheese whey's lactose stream was used for the production of the lactic acid bacteria *Lactiplantibacillus plantarum* (F_254), while the whey protein concentrate was applied for edible film synthesis. Subsequently, the films were studied as encapsulation carriers of freeze-dried cells of *Lactiplantibacillus plantarum* (F_254), exploring their effect on cell viability under different storage conditions (5°C and 25°C) over 90 days. Furthermore, the impact of adding bacterial nanocellulose (BCNW at 0%, 5%, and 10%) to the films on the viability of *Lactiplantibacillus plantarum* was studied. The study focused on the determination of physical properties of the edible films, giving greater emphasis on the viability of the strain after encapsulation in the films. Results showed that among the different cryoprotective materials, deproteinized cheese whey was the most suitable for maintaining the viability of F_254 during lyophilization. Also, encapsulation in edible films appeared to be particularly effective for the viability of the strain. In particular, the non-encapsulated lyophilized cells showed a viability reduction of 74% at 5 °C after 90 days of storage, while the best results were obtained from edible films with 5% and 10% BCNW showing a viability of 83% (9.2 Log CFU/g). The effect of BCNW was also evident, as the absence of BCNW resulted in 73% viability (8 Log CFU/g). The preservation of viability appeared to be the result of the synergistic effect of storage temperature and BCNW concentration. Specifically, in the case of storing films at 25 °C, cell viability was 65% in edible films containing 5% BCNW and 61% in films without BCNW. Finally, the ability of edible films to release lactic acid bacteria was studied using two different food simulation solutions and results showed that the highest release rate was observed in the edible films with BCNW. In summary, this study demonstrated that edible films can significantly contribute to the maintenance of the viability of strain F_254, while the incorporation of BCNW into the encapsulation matrix, as well as the storage conditions, played a key role.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Γαλακτικά βακτήρια	1
1.1.1 Προβιοτικά γαλακτικά βακτήρια	2
1.2 Βιολειτουργικά ή λειτουργικά τρόφιμα	4
1.3 Ενθυλάκωση προβιοτικών βακτηρίων.....	4
1.3.1 Ανάλυση τεχνικών ενθυλάκωσης	5
1.3.2 Ανάπτυξη εδώδιμων μεμβρανών ως φορείς ενθυλάκωσης προβιοτικών βακτηρίων	8
1.4 Αξιοποίηση τυρογάλακτος.....	9
1.5 Βακτηριακή κυτταρίνη και νανοκυτταρίνη	11

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

2. ΣΚΟΠΟΣ	12
------------------------	-----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
3.1 Βιολογικό υλικό.....	14
3.2 Παραγωγή βιομάζας	14
3.2.1 Προετοιμασία τυρογάλακτος για παραγωγή βιομάζας.....	14
3.2.2 Ζύμωση γαλακτικών βακτηρίων σε βιοαντιδραστήρα για την παραγωγή βιομάζας.....	15
3.3 Επιλογή κατάλληλου κρυοπροστατευτικού υλικού.....	16
3.4 Ζύμωση για την παραγωγή βακτηριακής νανοκυτταρίνης (BCNW).....	17
3.5 Διαδικασία παρασκευής εδώδιμων μεμβρανών από πρωτεΐνη τυρογάλακτος.....	17
3.6 Προσδιορισμός μικροβιακού πληθυσμού.....	19
3.7 Ιδιότητες εδώδιμων μεμβρανών	19
3.8 Απελευθέρωση γαλακτικών βακτηρίων σε διαλύματα προσομοίωσης τροφίμων	22

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙV.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	23
4.1 Παραγωγή βιομάζας γαλακτικού βακτηρίου F_254.....	23
4.2 Επιλογή κατάλληλου κρυοπροστατευτικού υλικού.....	23
4.3 Ανάπτυξη εδώδιμων μεμβρανών και μελέτη φυσικών ιδιοτήτων	25
4.4 Επίδραση εγκλωβισμού σε εδώδιμες μεμβράνες και προσθήκης βακτηριακής νανοκυτταρίνης στη διατήρηση της βιωσιμότητας του <i>L. plantarum</i> (F_254)	30
4.4.1 Αποθήκευση στους 5 °C	30
4.4.1 Αποθήκευση στους 25 °C	33
4.5 Συγκριτική αξιολόγηση ρυθμού μείωσης βιωσιμότητας στις διαφορετικές συνθήκες	35
4.6 Απελευθέρωση γαλακτικών βακτηρίων σε διαλύματα προσομοίωσης τροφίμων	37

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	41
-----------------------------	-----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43
-----------------------------	-----------

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 4.1 Ρυθμός μείωσης βιωσιμότητας του <i>L.plantarum</i> F_254	38
--	----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 3.1 Πορεία παραγωγής βιολειτουργικών εδώδιμων μεμβρανών.....	13
Εικόνα 3.2 α) Διαδικασία κατακρήμνισης πρωτεϊνών τυρογάλακτος β) Διήθηση τυρογάλακτος υπό κενό	15
Εικόνα 3.3 Ζύμωση του στελέχους <i>L. plantarum</i> (F_254) σε βιοαντιδραστήρα κλειστού τύπου και υπόστρωμα αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος.....	16
Εικόνα 3.4 Λυοφιλωμένη βιομάζα του στελέχους <i>L. Plantarum</i> (F_254)	16
Εικόνα 3.5 Βακτηριακή ναοκυτταρίνη πριν και μετά την έκπλυση.....	17
Εικόνα 3.6 Εδώδιμες μεμβράνες από πρωτεΐνη τυρογάλακτος.....	18
Εικόνα 3.7 Καταμέτρηση αποικιών για τον προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού.	19
Εικόνα 3.8 Προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό της διαπερατότητας υδρατμών.	21
Εικόνα 3.9 Απελευθέρωση γαλακτικού βακτηρίου σε υδατικά διαλύματα προσομοιωτών τροφίμων, νερό και οξικό οξύ(3%) τη χρονική στιγμή T2 και T6.	22
Εικόνα 4.1 Εδώδιμες μεμβράνες από πρωτεΐνη τυρογάλακτος με διαφορετικές συγκεντρώσεις BCNW	25

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 4.1. Ζύμωση για παραγωγή βιομάζας γαλακτικού βακτηρίου F_254 με υπόστρωμα αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος	23
Γράφημα 4.2. Επίδραση κρυοπροστατευτικού υλικού στη βιωσιμότητα του στελέχους <i>L. plantarum</i> (F_254) μετά τη λυοφιλίωση	24
Γράφημα 4.3. Πάχος εδώδιμων μεμβρανών με ενθυλακωμένο στέλεχος <i>L. plantarum</i> (F_254), και προσθήκη 0% ,5% και 10% BCNW	27
Γράφημα 4.4 Υγρασία(%) εδώδιμων μεμβρανών με ενθυλακωμένο στέλεχος <i>L. plantarum</i> (F_254),και προσθήκη 0% ,5% και 10% BCNW.....	28
Γράφημα 4.5 Διαλυτότητα μεμβρανών(%) εδώδιμων μεμβρανών με ενθυλακωμένο στέλεχος <i>L. plantarum</i> (F_254), και προσθήκη 0% ,5% και 10% BCNW..	28
Γράφημα 4.6 Ικανότητα συγκράτησης νερού(%)εδώδιμων μεμβρανών με ενθυλακωμένο στέλεχος <i>L. plantarum</i> (F_254), και προσθήκη 0% ,5% και 10% BCNW.....	29
Γράφημα 4.7 Διαπερατότητα σε υδρατμούς εδώδιμων μεμβρανών με ενθυλακωμένο στέλεχος <i>L. plantarum</i> (F_254), και προσθήκη 0% ,5% και 10% BCNW.	29
Γράφημα 4.8. Έλεγχος της βιωσιμότητας του στελέχους <i>L. plantarum</i> (F_254) πριν και μετά την ενθυλάκωση σε εδώδιμες μεμβράνες με 0% ,5% και 10% BCNW και αποθήκευση στους 5 °C, για 90 ημέρες	31
Γράφημα 4.9. Πορεία πληθυσμού του στελέχους <i>L. plantarum</i> (F_254) πριν και μετά την ενθυλάκωση σε εδώδιμες μεμβράνες με 0% ,5% και 10% BCNW και αποθήκευση στους 5 °C, για 90 ημέρες	32
Γράφημα 4.10 Έλεγχος της βιωσιμότητας του στελέχους <i>L. plantarum</i> (F_254) πριν και μετά την ενθυλάκωση σε εδώδιμες μεμβράνες με 0% ,5% και 10% BCNW και αποθήκευση στους 25 °C, για 90 ημέρες.	33
Γράφημα 4.11 Πορεία πληθυσμού του στελέχους <i>L. plantarum</i> (F_254) πριν και μετά την ενθυλάκωση σε εδώδιμες μεμβράνες με 0% ,5% και 10% BCNW και αποθήκευση στους 25 °C, για 90 ημέρες	34
Γράφημα 4.12 Ρυθμός μείωσης του μικροβιακού πληθυσμού του στελέχους <i>L.plantarum</i> (F_254) πριν και μετά την ενθυλάκωση σε εδώδιμες μεμβράνες με 0%, 5% και 10% BCNW κατά την αποθήκευση στους 5°C , για 90 ημέρες.....	36
Γράφημα 4.13 Ρυθμός μείωσης του μικροβιακού πληθυσμού του στελέχους <i>L.plantarum</i> (F_254) πριν και μετά την ενθυλάκωση σε εδώδιμες μεμβράνες με 0%, 5% και 10% BCNW κατά την αποθήκευση στους 25°C , για 90 ημέρες	37
Γράφημα 4.14. Πορεία μικροβιακού πληθυσμού του στελέχους <i>L. plantarum</i> (F_254), ενθυλακωμένο σε εδώδιμες μεμβράνες με προσθήκη 0% ,5% και 10% βακτηριακής κυτταρίνης, σε υδατικό διάλυμα προσομοιωτή τροφίμου με υψηλή υγρασία.....	38
Γράφημα 4.15 Μικροβιακός πληθυσμός του στελέχους <i>L. plantarum</i> (F_254), σε εδώδιμες μεμβράνες με προσθήκη 0% ,5% και 10% BCNW σε προσομοιωτή τροφίμου με υδρόφιλο και όξινο χαρακτήρα.	39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γαλακτικά βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια (Lactic acid bacteria, LAB) είναι μια ομάδα θετικών κατά gram (Gram⁺) βακτηρίων, αρνητικών στην οξειδάση και στη καταλάση. Είναι μη σπορογόνα, με δομή ραβδίων ή κόκκων, προαιρετικά αναερόβια, ανθεκτικά σε οξέα, με αποκλειστικά ζυμωτικό μεταβολισμό (Madigan et al., 2021); Ana et al., 2007).

Στην ομάδα των LAB, ανήκουν κυρίως τα γένη: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, και *Weissella* (Björkroth, J., 2016).

Τα LAB έχουν την μεταβολική ικανότητα να ζυμώνουν μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη) και δισακχαρίτες (σακχαρόζη, μαλτόζη, λακτόζη), παράγοντας ως κύριο προϊόν μεταβολισμού τους το γαλακτικό οξύ. Βάσει του μεταβολισμού που επιτελούν τα LAB διακρίνονται σε ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά. Τα LAB της ομοζυμωτικής ομάδας παράγουν κυρίως ένα προϊόν ζύμωσης, το γαλακτικό οξύ, ενώ τα βακτήρια της ετεροζυμωτικής ομάδας παράγουν εκτός από γαλακτικό οξύ οξικό οξύ αιθανόλη και CO₂, μέσω της αντίδρασης της γαλακτικής αφυδρογονάσης (Αγγελής 2017). Ακόμη, καταναλώνουν σάκχαρα (εξόζες) χρησιμοποιώντας μεταβολικές οδούς Embden- Meyerhof- Parnas και της φωσφοροακετολάσης, σχηματίζοντας γαλακτικό οξύ ως κύριο τελικό προϊόν (Björkroth, J., 2016).

Τα LAB, εμπλέκονται σε μεγάλο αριθμό βιομηχανικών ζυμώσεων τροφίμων όπου χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης ή/ και ως συμπληρωματικές καλλιέργειες. Η κύρια συνεισφορά τους είναι η ταχεία παραγωγή οξέων για την οξίνιση των τροφίμων ενώ οι μεταβολικές διεργασίες που συνοδεύουν την ανάπτυξη των LAB επηρεάζουν επίσης τη γεύση και άλλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως η υφή.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, λόγω της κατανάλωσης σακχάρων χρήσιμων για κάποια τρόφιμα, τα LAB, μπορεί να οδηγούν στην αλλοίωση του προϊόντος. Επιπλέον, τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση έχουν μεγαλύτερη θερμιδική αξία, είναι ασφαλέστερα και λιγότερο ευπαθή, αφού το χαμηλό pH, η παρουσία/ παραγωγή οργανικών οξέων ή και αντιμικροβιακών ενώσεων από τα ίδια, εμποδίζει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών.

Η τεχνολογία ζύμωσης τροφίμων, καθώς και τεχνικές επεξεργασίας όπως η ξήρανση και η προσθήκη αλάτος αποτελούν από τις αρχαιότερες τεχνικές συντήρησης τροφίμων που είναι γνωστές στον άνθρωπο. Οι άνθρωποι, από προηγούμενες εποχές, βοηθούν τέτοιες μεθόδους προσθέτοντας σκόπιμα μια μερίδα προηγουμένως ζυμωμένης τροφής στη νέα παρτίδα πρώτων υλών (το λεγόμενο «back-slopping») προκειμένου να προωθηθεί η επιτυχής ζύμωση. Επιπλέον, συγκεκριμένες παραδοσιακές τεχνολογίες συχνά οδηγούν στην επικράτηση συγκεκριμένων τύπων LAB, γεγονός που προσδίδει στο προϊόν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Γενικά, τα LAB συναντώνται σε διάφορα φυσικά περιβάλλοντα όπως σε φυτά και καρπούς δέντρων (ελιές, σύκα κ.α.), κρέας και κρεατοσκευάσματα, γαλακτοκομικά προϊόντα, τρόφιμα που συντηρούνται σε θερμοκρασία ψύξης (συσκευασμένο σε κενό αέρος κρέας), ενώ αποτελούν την ενδογενή μικροχλωρίδα του ανθρώπου (Iskandar et al., 2019).

Στις ζυμώσεις γιαουρτιού, τυριού, αλαντικών, ζυμωτού ψωμιού και κρασιού, τα LAB είναι οι βασικοί οργανισμοί που παρέχουν τον επιθυμητό οργανοληπτικό χαρακτήρα, αυξημένη διάρκεια ζωής και ασφάλεια του προϊόντος. Πολλά στελέχη *Lactobacillus spp* και *Lactococcus spp.*, εκτός από το σημαντικό σκοπό που διαδραματίζουν στις ζυμώσεις τροφίμων, έχουν συνδεθεί με την παροχή αρκετά σημαντικών ωφελειών για την υγεία. Για το λόγο αυτό έχουν χαρακτηριστεί ως προβιοτικά καθώς όπως και ετυμολογικά προκύπτει συμβάλλουν διατήρηση καλής υγείας για τον ξενιστή. Τα LAB θεωρούνται κύρια ομάδα προβιοτικών βακτηρίων και απαντώνται τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα (Sornplang et al., 2016).

Εκτός από τα «GRAS» (General regarded as safe/ γενικά θεωρούμενα ως ασφαλή) βακτήρια, περιλαμβάνονται ορισμένα παθογόνα είδη. Για παράδειγμα, υπάρχουν παθογόνα προς τον άνθρωπο και τα ζώα στελέχη των ειδών *Aerococcus*, *Streptococcus* και *Enterococcus*. Μια άλλη σειρά επιβλαβών LAB είναι τα ψυχροτροφικά LAB, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν σε αποθήκευση σε ψυγείο. Αυτά τα βακτήρια είναι αλλοιωτικοί οργανισμοί σε συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα κρέατα και προϊόντα ψαριών (Björkroth, J., 2016).

1.1.1 Γαλακτικά βακτήρια με προβιοτικές ιδιότητες

Προβιοτικά, σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, ορίζονται ως «ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες ($>10^6$ log CFU/g), παρέχουν οφέλη για την υγεία του ξενιστή», (FAO/WHO, 2006). Πολύ σημαντικό

ρόλο στη πρόσληψη της συνισταμένης ποσότητας παίζει η διάρκεια ζωής του προβιοτικού στο τρόφιμο κατά τη συσκευασία, μεταφορά και συντήρηση του, αλλά και η ανθεκτικότητά του στις συνθήκες πέψης κατά την κατανάλωση από τον ξενιστή. Τα LAB για να θεωρηθούν προβιοτικά και να μπορούν να χορηγηθούν στον άνθρωπο πρέπει να έχουν χαρακτηριστεί ως «GRAS». Τα προβιοτικά στελέχη θα πρέπει να μην βλάπτουν τον ξενιστή ενώ θα πρέπει να παρέχουν σε αυτόν μία ή περισσότερες από τις βιολειτουργικές του ιδιότητες (Keresztény et al., 2023). Χαρακτηριστικά οφέλη από την παρουσία προβιοτικών, σχετίζονται με τη διατήρηση της ισορροπίας της εντερικής μικροχλωρίδας και του γαστρεντερικού σωλήνα, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ δύνανται να συμβάλουν στη βελτίωση συμπτωμάτων δυσκοιλιότητας, δυσανεξίας στη λακτόζη και διαταραχών του πεπτικού που σχετίζονται με τη λήψη αντιβιοτικών (Pereira et al., 2024). Επιπρόσθετα, τα προβιοτικά φαίνεται να συμβάλουν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, στη μείωση επιπέδων χοληστερόλης και στην αντιμετώπιση διαφόρων τύπου διαβήτη (Soukoulis et al., 2014). Τέλος, ιδιαίτερα σημαντική είναι η συμβολή των προβιοτικών βακτηρίων στην αντιμετώπιση φλεγμονωδών νόσων του πεπτικού συστήματος (νόσος του Crohn, παγκρεατίτιδα, ελκώδης κολίτιδα κ.α.) αλλά και στην αντιμετώπιση του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου, διαφόρων αλλεργιών και συγκεκριμένων μορφών καρκίνου, ενώ έχει δειχθεί και η θετική επίδραση έναντι ψυχολογικών διαταραχών (FAO/WHO, 2006; Amirani et al., 2020).

Όπως έχει προαναφερθεί για να μπορέσουν τα προβιοτικά στελέχη να ωφελήσουν τον ξενιστή, θα πρέπει να παρευρίσκονται στον οργανισμό του σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Για το σκοπό αυτό, είναι απαραίτητο τα στελέχη αυτά να έχουν ορισμένες ιδιότητες ώστε να μπορέσει να διασφαλιστεί η βιωσιμότητά τους κατά τη διαδικασία της πέψης. Οι ιδιότητες αυτές, εκτός από την απόδοση λειτουργικών ιδιοτήτων σχετίζονται και με την ανθεκτικότητα των στελεχών στις χαμηλές τιμές pH αλλά και στην παρουσία χολικών αλάτων ενώ για να είναι ασφαλή προς τον ξενιστή, θα πρέπει να είναι αρνητικά στη δοκιμή της αιμόλυσης. Επιπλέον γνωρίσματα των προβιοτικών στελεχών είναι η παραγωγή ουσιών που παρεμποδίζουν την αύξηση παθογόνων μικροοργανισμών αλλά και η ευαισθησία τους έναντι αντιβιοτικών (Terpou et al., 2019).

Τα πιο διαδεδομένα προβιοτικά στελέχη που απαντώνται στον ανθρώπινο οργανισμό ή χορηγούνται σε αυτόν μέσω συμπληρωμάτων (κάψουλες) ανήκουν τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (El Far et al., 2023).

1.2 Βιολειτουργικά ή λειτουργικά τρόφιμα

Η έννοια των λειτουργικών τροφίμων ξεκίνησε στην Ιαπωνία στα μέσα του 1980. Λίγες δεκαετίες αργότερα ακολούθησαν οι Ηνωμένες Πολιτείες και οι ευρωπαϊκές χώρες, χωρίς όμως να έχουν δώσει επίσημο ορισμό στα λειτουργικά τρόφιμα (Pereira et al., 2024).

Στις μέρες μας, όλο και περισσότερο αυξάνεται η ζήτηση των καταναλωτών για προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας, γεγονός που έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη και παραγωγή λειτουργικών τροφίμων. Ως βιολειτουργικά ή λειτουργικά τρόφιμα ορίζονται τρόφιμα, φυσικά ή επεξεργασμένα τα οποία περιέχουν συστατικά που στοχεύουν σε συγκεκριμένες λειτουργίες του οργανισμού, πέρα από τη θρεπτική τους αξία. Προσφέρονται με τον ισχυρισμό ότι προάγουν την υγεία ή ότι παρέχουν οφέλη πέρα των αναμενόμενων συνεπώς, δρουν συνεργατικά για τη διαμόρφωση μιας σωστής και ισορροπημένης διατροφής (Gonçalves et al., 2022). Υπάρχουν αρκετές κατηγορίες λειτουργικών τροφίμων με θετικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Ορισμένα από τα τρόφιμα αυτά, μπορεί να έχουν υποστεί επεξεργασία- πρόσθεση, αφαίρεση, τροποποίηση, ενός ή περισσότερων συστατικών-. Κάποια παραδείγματα τέτοιων τροφίμων είναι: Ροφήματα και χυμοί φρούτων εμπλουτισμένα με βιταμίνες, προϊόντα lactose free (χωρίς λακτόζη) και gluten free (χωρίς γλουτένη), γαλακτοκομικά προϊόντα με προσθήκη β γλυκάνης, μαργαρίνες εμπλουτισμένες με φυσικές στερόλες αλλά και γιαούρτια ζυμωμένα με προβιοτικές καλλιέργειες (Pereira et al., 2024; Σφλώμος, 2019).

1.3 Ενθυλάκωση προβιοτικών βακτηρίων

Ως ενθυλάκωση ορίζεται η τεχνολογία εγκλεισμού στερεών, υγρών ή αέριων υλικών σε μικροσκοπικές σφραγισμένες κάψουλες οι οποίες μπορούν να απελευθερώσουν το περιεχόμενό τους σε ελεγχόμενα ποσοστά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Σκοπός της ενθυλάκωσης είναι η προστασία του υλικού που ενθυλακώνεται από την πλήρη αποικοδόμηση ή τη μερική αλλοίωση, μειώνοντας την αντίδρασή του με περιβαλλοντικές συνθήκες. Η τεχνική αυτή επιτρέπει τη σταθεροποίηση υλικού του πυρήνα, μέσω του ελέγχου πιθανών οξειδωτικών αντιδράσεων, την κάλυψη οσμών, γεύσεων, χρωμάτων, την ελεγχόμενη απελευθέρωσή του, τη διατήρηση της

διατροφικής του αξίας, και σε περίπτωση που πρόκειται για την ενθυλάκωση μικροοργανισμών την παράταση του χρόνου ζωής του (Anal et al., 2007 β).

Για την ενθυλάκωση προβιοτικών βακτηρίων χρησιμοποιούνται διάφορα υλικά. Μερικά από αυτά είναι: Πολυσακχαρίτες (όπως αλγινικά, φυτικά/μικροβιακά κόμματα, χιτοζάνη, άμυλο, καραγεννάνη, κυτταρίνη), πρωτεΐνες ζωικής και φυτικής προέλευσης (αρακά, ζελατίνη, πρωτεΐνες τυρογάλακτος) και λίπη. Τα διάφορα υλικά ενθυλάκωσης προσδίδουν στα προβιοτικά στελέχη διαφορετικά πλεονεκτήματα. Έχουν τη δυνατότητα να αυξήσουν τη βιωσιμότητά τους καθώς τα προστατεύουν από αντίξοες για το βακτήριο συνθήκες (όξινο περιβάλλον, χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες) (Terrou et al., 2019).

1.3.1 Ανάλυση τεχνικών ενθυλάκωσης

Στις μέρες μας, αρκετές μέθοδοι ενθυλάκωσης μελετώνται εκτενώς και είναι διαθέσιμες προς αξιοποίηση και εφαρμογή από τη βιομηχανία τροφίμων. Κάθε μία διαφοροποιείται ως προς διάφορες παραμέτρους και έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, συνεπώς η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου είναι απαραίτητη και εξαρτάται από την εκάστοτε εφαρμογή. Εκτός από την επιλογή της τεχνικής για την ενθυλάκωση απαραίτητη είναι και η επιλογή των κατάλληλων υλικών που θα χρησιμοποιηθούν ως υλικά «μήτρες» για την εφαρμογή αυτής (πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυσακχαρίτες κ.α.). Κύριες μέθοδοι ενθυλάκωσης οι οποίες θα αναλυθούν παρακάτω αποτελούν η ξήρανση με κατάψυξη, η ξήρανση με ψεκασμό, η ενθυλάκωση σε εδωδιμες μεμβράνες, και η δημιουργία γαλακτωμάτων.

Λυοφιλίωση: Η λυοφιλίωση περιεγράφηκε για πρώτη φορά το 1906 και έχει χρησιμοποιηθεί για διατήρηση ιών, εμβολίων στα τέλη της δεκαετίας του 1940 (Morais et al., 2016). Είναι μια διαδικασία αφυδάτωσης που πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες κατά την οποία το νερό μεταβιβάζεται από τη στερεά κατάσταση στην αέρια, χωρίς να διέρχεται από την υγρή κατάσταση (εξάχνωση). Κατά τη λυοφιλίωση αφαιρείται ενδοκυτταρικό νερό από τα βακτήρια έως ότου επιτευχθεί ένα χαμηλό επίπεδο ενεργότητας νερού ($a_w \leq 0,2$), το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή την αποβολή των μεταβολικών δραστηριοτήτων των κυττάρων. Η διαδικασία αποτελείται από τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά τη κατάψυξη, ένα κρίσιμο βήμα για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του βακτηρίου κατά τη διάρκεια της λυοφιλίωσης. Κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, σχηματίζεται πρώτα

πάγος στο εξωκυττάριο τμήμα, διότι η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας είναι υψηλότερη ενδοκυτταρικά από ότι εξωκυτταρικά. Αυτή η διαφορά στην οσμωτική πίεση έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά του νερού έξω από τα κύτταρα, συνεπώς την αφυδάτωσή τους.

Το δεύτερο στάδιο είναι η εξάχνωση (πρώτο στάδιο ξήρανσης). Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου μειώνεται η πίεση στον λυοφιλιωτή και προκαλείται εξάχνωση του παγωμένου νερού. Η θερμοκρασία του προϊόντος πρέπει να διατηρείται κάτω από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) καθ' όλη τη διάρκεια της λυοφιλίωσης.

Επιπλέον, η εξάχνωση πρέπει να ολοκληρωθεί πριν η θερμοκρασία του προϊόντος φτάσει στο σημείο τήξης του πάγου ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$), ώστε να αποφευχθεί η κατάρρευση του προϊόντος. Μετά την εξάχνωση, το δεσμευμένο νερό του προϊόντος αφαιρείται κατά τη διάρκεια ενός δεύτερου σταδίου ξήρανσης, το οποίο περιλαμβάνει μια μικρή αύξηση της θερμοκρασίας. Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος, η θερμοκρασία του προϊόντος πρέπει επίσης να διατηρείται κάτω από την T_g . Η δευτερεύουσα ξήρανση έχει ολοκληρωθεί όταν επιτυγχάνονται χαμηλές τιμές a_w του προϊόντος (συνήθως κάτω από 0,2).

Η μέθοδος αυτή, λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών που διεξάγεται, επιτρέπει τη διατήρηση των βιοδραστικών ενώσεων (φυσικές και χημικές ιδιότητες) αλλά και την επιβίωση των μικροοργανισμών. Παρόλα αυτά, κατά το στάδιο της κατάψυξης μπορεί να προκύψουν βλάβες στα κύτταρα οι οποίες εξαρτώνται από την κινητική φάση της κατάψυξης. Σε γρήγορους ρυθμούς κατάψυξης προκαλείται συρρίκνωση και κυστίδωση, ενώ υπό αργή κατάψυξη προκαλείται υπεροσμωτικό στρες και αφυδάτωση. Προκειμένου να αποφευχθεί ο κυτταρικός θάνατος κατά τη λυοφιλίωση αλλά και κατά τη συντήρηση, λαμβάνονται κάποια μέτρα προστασίας: έλεγχος του ρυθμού ψύξης, χρήση κρυοπροστατευτικών υλικών (π.χ.: πρωτεΐνη τυρογάλακτος, σουκρόζη, λακτόζη κ.α.), έλεγχος των συνθηκών αποθήκευσης. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που το κόστος μεταφοράς του λυοφιλιωμένου προϊόντος είναι χαμηλό, η λυοφιλίωση είναι 4-8 φορές πιο ακριβή από άλλες μεθόδους, ενώ καταναλώνει 2-5 φορές περισσότερη ενέργεια. (Bodzen et al.,2021; Mohammady et al.,2020)

Ξήρανση με ψεκασμό: Η χρήση της ξήρανσης με ψεκασμό ως τεχνική ενθυλάκωσης ξεκίνησε από το 1930, ενώ το 1960 υιοθετήθηκε ως τεχνολογία ενθυλάκωσης για πτητικές ενώσεις. Η ενθυλάκωση με ξήρανση με ψεκασμό είναι καθιερωμένη διαδικασία που μπορεί να παράγει μεγάλες ποσότητες τελικού προϊόντος (Haji et al.,

2022). Η ξήρανση με ψεκασμό είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος ενθυλάκωσης στη βιομηχανία τροφίμων. Περιλαμβάνει ψεκασμό του διαλύματος τροφοδοσίας σε θάλαμο ξήρανσης με ζεστό αέρα, όπου η εξάτμιση του νερού λαμβάνει χώρα από τα ψεκασμένα σταγονίδια για να σχηματιστεί ξηρή σκόνη.

Τα πλεονεκτήματα της ξήρανσης με ψεκασμό είναι η παραγωγή αποξηραμένων σκονών, η ικανότητα ελέγχου του μεγέθους των σωματιδίων, το γρήγορο στέγνωμα, η εύκολη κλιμάκωση και συνεχής παραγωγή, και το μειωμένο κόστος αποθήκευσης και μεταφοράς αναφορικά με το τελικό προϊόν (Muhosa et al., 2023). Επιπρόσθετα, είναι μια μέθοδος με υψηλή απόδοση και χαμηλό κόστος, ενώ η σταθερότητα αποθήκευσης που προσφέρει ενισχύει την ικανότητα διασποράς και μπορεί να ελέγξει την απελευθέρωση βιοδραστικών ενώσεων.

Υδατάνθρακες όπως το άμυλο, η μαλτοδεξτρίνη και ο φρουκτοολιγοσακχαρίτης (FOS), χρησιμοποιούνται για ενθυλάκωση με ξήρανση ψεκασμό. Επιπλέον, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι εξαιρετικό υλικό ενθυλάκωσης λόγω της γαλακτωματοποίησης, της ζελατινοποίησης και των ιδιοτήτων σχηματισμού φιλμ της. Ωστόσο, αυτή η οικονομική και αποτελεσματική τεχνολογία για την προστασία των υλικών σπάνια χρησιμοποιείται για ακινητοποίηση κυττάρων, λόγω της υψηλής θνησιμότητας που προκύπτει από την ταυτόχρονη αφυδάτωση και θερμική αδρανοποίηση των μικροοργανισμών (Haji et al., 2022).

Γαλακτώματα: Γαλακτώμα ονομάζεται ένα κολλοειδές σύστημα, το οποίο αποτελείται από τουλάχιστον δύο μη αναμιγνύόμενα υγρά. Το ένα υγρό, η διεσπαρμένη φάση, διασπείρεται μέσα σε ένα άλλο, τη συνεχή φάση. Η διαδικασία σχηματισμού γαλακτώματος ονομάζεται γαλακτωματοποίηση. Η γαλακτωματοποίηση είναι μια δυναμική και μη αυθόρμητη διαδικασία, η οποία πραγματοποιείται μέσω φυσικών διεργασιών (μηχανικό χτύπημα) ,ή μέσω χημικών διεργασιών (Singh., 2024). Οι χημικές μέθοδοι εξαρτώνται από τη τιμή υδρόφιλου-υδρόφοβου ισοζυγίου (HLB) του γαλακτωματοποιητή και τη συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή .

Οι φυσικές μέθοδοι χρησιμοποιούν μια συσκευή γαλακτωματοποίησης με υψηλή διάτμηση ή δυνατότητες υψηλής πίεσης. Συχνά, χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός φυσικών και χημικών μεθόδων για την παρασκευή γαλακτωμάτων. Τα είδη γαλακτωμάτων που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής: λάδι σε νερό (O/W), νερό σε λάδι (W/O), και πολλαπλό γαλακτώμα (W/O/W) (Haji et al., 2022).

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν γαλακτώματα για την ενθυλάκωση προβιοτικών κυττάρων. Τα γαλακτώματα είναι καλά συστήματα μεταφοράς καθώς αυξάνουν τη

διαλυτότητα βιοδραστικών ενώσεων, διευκολύνουν τη μεταφορά στο γαστρεντερικό σύστημα, παρέχουν προστασία έναντι των σκληρών συνθηκών περιβάλλοντος και συντηρούν το προβιοτικό μέχρι την απελευθέρωση του. Δεδομένου ότι τα εναιωρήματα γαλακτώματος είναι ευαίσθητα σε φυσική και χημική αποδόμηση και μικροβιακή μόλυνση, μετατρέπονται σε σκόνες για τη βελτίωση της σταθερότητας αποθήκευσης (Muhoza et al., 2023). Τα χαρακτηριστικά του γαλακτώματος μπορούν να αλλάξουν καθώς σχηματίζεται και συνεχίζει να στερεοποιείται και επηρεάζεται από διάφορες μεταβλητές, συμπεριλαμβανομένων θερμοκρασία, χρόνος, ταχύτητα ανάδευσης και πίεση (Singh., 2024).

Πέρα από τις μεθόδους αυτές, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και άλλες νέες τεχνολογίες οι οποίες υπόκεινται στο αντικείμενο της βιοτεχνολογίας και της επεξεργασίας τροφίμων. Οι τεχνολογίες αυτές βασίζονται στην εφαρμογή διαφόρων φυσικοχημικών μεθόδων για την ανάπτυξη δομών πολυμερών τα οποία λειτουργούν ως φορείς ενθυλάκωσης διαφόρων συστατικών. Μια από αυτές τις τεχνολογίες είναι και η ανάπτυξη εδωδιμών μεμβρανών από πρωτεΐνη τυρογάλακτος στην οποία αναφέρεται και η παρούσα μελέτη οι οποίες μάλιστα, μπορούν να αξιοποιηθούν σε διάφορες εφαρμογές.

1.3.2 Ανάπτυξη εδωδιμών μεμβρανών ως φορείς ενθυλάκωσης προβιοτικών βακτηρίων

Οι εδωδιμες μεμβράνες μπορούν να περιγραφούν ως βρώσιμες πλαστικοποιημένες δομές. Είναι βιοπολυμερή, που κυρίως αποτελούνται από πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, υδροκολλοειδή, και λιπίδια. Τα τελευταία χρόνια, έχουν απασχολήσει πολλές βιομηχανίες τροφίμων και πολλούς ερευνητές του κλάδου, καθώς εμφανίζουν αρκετές προοπτικές.

Οι εδωδιμες μεμβράνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα, δημιουργώντας μια ασπίδα προστασίας, καθυστερώντας την πραγματοποίηση επιβλαβών αντιδράσεων (μεταφορά υδρατμών, οξυγόνου και διαλυμένων ουσιών), με συνέπεια την αύξηση του χρόνου ζωής του τροφίμου. Επιπρόσθετα, με τη θωράκιση του τροφίμου από την εδωδιμη μεμβράνη το χρώμα του τροφίμου, η γεύση του και τα συστατικά του, παραμένουν αναλλοίωτα. Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως οι εδωδιμες μεμβράνες συντελούν στη μείωση του αρνητικού αντίκτυπου του τροφίμου στο περιβάλλον μετά την κατανάλωση του, καθώς αποτελούν εναλλακτική των συνθετικών μεμβρανών

(πλαστικών) που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα (Saleena et al.,2023).

Ακόμη ένα πλεονέκτημα των εδώδιμων μεμβρανών είναι η δυνατότητα ενθυλάκωσης μικροοργανισμών ή/και λειτουργικών προσθέτων, «GRAS» και κατάλληλων για κατανάλωση συστατικών (π.χ.: αντιοξειδωτικά, βιταμίνες, αντιμικροβιακές ουσίες, οργανικά οξέα, φυτικά εκχυλίσματα, αιθέρια έλαια, χρωστικές ουσίες, χημικά συντηρητικά και προβιοτικά) (Soukoulis et al.,2017; Saleena et al.,2023).

Οι εδώδιμες μεμβράνες ως φορείς ενθυλάκωσης προβιοτικών εμφανίζουν κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα. Αρχικά, ενισχύουν τη βιωσιμότητα των ενθυλακωμένων συστατικών προστατεύοντας τα από έκθεση σε γαστρικά υγρά κατά τη διέλευση στην τροφική οδό και στο γαστρεντερικό σωλήνα. Είναι μια απλή και φθηνή τεχνική που έχει πολλές δυνατότητες χρήσης σε φρέσκα και ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα χωρίς να απαιτείται η χρήση ακριβών συστατικών και εργαστηριακού εξοπλισμού. (Soukoulis et al., 2014). Το κόστος μπορεί να μειωθεί ακόμα περισσότερο με τη χρήση επεξεργασμένων αποβλήτων ως πρώτη ύλη.

Οι εδώδιμες μεμβράνες, σύμφωνα με διάφορες έρευνες που έχουν διεξαχθεί, έχουν εμφανίσει αντιμικροβιακές ιδιότητες, καθώς και να αυξάνουν τη βιωσιμότητα των εκάστοτε ενθυλακωμένων μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, στην έρευνα των (Soukoulis et al., 2014), ενθυλακώθηκε το στέλεχος *L. rhamnosus* GG σε δυο διαφορετικά είδη μεμβρανών. Το ένα περιείχε 1% αλγινικό νάτριο, 2% πρωτεΐνη ορού γάλακτος, ενώ το άλλο 4% (w/w) πολυδεξτρόζη 4% (w/w), ινουλίνη 4% (w/w) γλυκο-ολιγοσακχαρίτες 4% (w/w), δεξτρίνη σίτου 4% (w/w) και γλυκερόλη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι εδώδιμες μεμβράνες βοήθησαν τη βιωσιμότητα των βακτηριακών στελεχών κατά τη διαδικασία του στεγνώματος αλλά και κατά τη συντήρηση, χωρίς να επηρεάζεται η υφή ή η γεύση του προϊόντος. Στην έρευνα των (Gialamas et al., 2010) , κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν εδώδιμες μεμβράνες, παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση των εδώδιμων μεμβρανών, καθώς επίσης και η ανάπτυξη μιας εναλλακτικής συσκευασίας η οποία ενισχύει την ασφάλεια των τροφίμων.

1.4 Αξιοποίηση τυρογάλακτος

Το τυρόγαλα, είναι υποπροϊόν της βιομηχανίας γάλακτος. Πρόκειται για το υγρό απόβλητο που προέρχεται από τη παραγωγή τυριού, πιο συγκεκριμένα από τη διαδικασία συσσωμάτωσης της καζεΐνης σε μικκύλια. Αποτελείται από νερό και

περίπου το 50% των στερεών συστατικών του γάλακτος, το οποίο περιέχει 66-77% (w/w) λακτόζη, 8-15% (w/w) σφαιρικές πρωτεΐνες και 7-15% (w/w) μεταλλικά άλατα. Η ποσότητα τυρογάλακτος που παράγεται, εξαρτάται από το είδος του τυριού που παράγεται ενώ η σύστασή του σχετίζεται με την περίοδο τυροκόμησης αλλά και το ζώο από το οποίο προέρχεται το γάλα. Αναφορικά, για κάθε κιλό τυριού που παράγεται, προκύπτουν περίπου εννέα λίτρα τυρογάλακτος. Οι μεγάλοι όγκοι που παράγονται παγκοσμίως σε συνδυασμό με τις συγκεντρώσεις του σε συστατικά που δύσκολα βιοαποικοδομούνται (λακτόζη και πρωτεΐνες) το καθιστούν το νούμερο ένα ρύπο της βιομηχανίας γάλακτος. Οι απαιτήσεις σε οξυγόνο για τη χημική οξείδωση των οργανικών συστατικών του τυρογάλακτος (COD) κυμαίνονται από 50.000 έως 80.000 mg/L ενώ αντίστοιχα για τη βιοχημική οξείδωση (BOD) από 40.000 έως 60.000 mg/L.

Τις τελευταίες δεκαετίες, προκειμένου να αποφευχθεί η διάθεση του τυρογάλακτος στο περιβάλλον, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνολογίες διεργασιών και βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις, με σκοπό την αξιοποίηση του και τη παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Η πρωτεΐνη του τυρογάλακτος, σύμφωνα με αρκετές φυσικοχημικές μελέτες, έχει εμφανίσει λειτουργική και διατροφική αξία. Εκτός από τη χρήση της ως συμπλήρωμα διατροφής, η οποία είναι η πλέον διαδεδομένη, ενδιαφέρον αποτελεί και η αξιοποίησή της για την παρασκευή εδωδίων μεμβρανών όπως προτείνεται και στην παρούσα μελέτη. Επιπρόσθετα, τα υπόλοιπα συστατικά του τυρογάλακτος (λακτόζη, νερό, μέταλλα, ιχνοστοιχεία, και υπολειπόμενο ελεύθερο άζωτο) είναι ικανά ώστε να αποτελέσουν το υπόστρωμα για τη διεξαγωγή μικροβιακών ζυμώσεων προς παραγωγή βιομάζας και λοιπών βιοτεχνολογικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Με βάση όσα αναφέρονται παραπάνω η αξιοποίηση του τυρογάλακτος χρήζει ιδιαίτερης σημασίας και προσοχής από τη βιομηχανία των τροφίμων καθώς μπορεί να έχει διττό ρόλο στην απόδοση οφέλους για αυτή. Η αξιοποίηση του τυρογάλακτος συμβάλει στην απαλλαγή του οικοσυστήματος από ένα ακόμη απόβλητο υψηλού ρυπαντικού φορτίου, ενώ παράλληλα μπορεί να συμβάλει στη μείωση του κόστους παραγωγής των βιοτεχνολογικών προϊόντων καθώς εξαλείφει το κόστος για την προμήθεια πρώτων υλών (Lappa et al.,2021).

1.5 Βακτηριακή κυτταρίνη και νανοκυτταρίνη

Η βακτηριακή κυτταρίνη (BC) είναι ένας φυσικός μικροβιακός πολυσακχαρίτης, που παράγεται από τη ζύμωση διαφόρων ειδών *Acetobacter*.. Τα τελευταία χρόνια έχει απασχολήσει αρκετά την επιστημονική κοινότητα, εξαιτίας των πολλαπλών οφελών της. Παρουσιάζει παρόμοιες ιδιότητες με τη φυτική κυτταρίνη. Η BCNW έχει χαρακτηριστεί ως «GRAS», με πολυάριθμες εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και στη βιομηχανία φαρμάκων (Papadaki et al.,2022). Χρησιμοποιείται ως συστατικό τροφίμων, ενισχυτικό γεύσεως, υποκατάστατο λίπους, σταθεροποιητής, αλλά και ως συστατικό βιοαποικοδομήσιμης συσκευασίας (Lappa et al.,2021).

Για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα ζύμωσης αγροτοβιομηχανικά απόβλητα όπως: απόβλητα από βιομηχανίες βιοντίζελ και βιομηχανίες τροφίμων, όπως ηλιέλαιο, γλυκερίνη, υπολείμματα ζαχαροπλαστικής, υποπροϊόντα εσπεριδοειδών, πυρηνέλαιο, πεταμένες σταφίδες, κ.ά. Με αυτό το τρόπο μειώνεται το κόστος παραγωγής αλλά και οι ρύποι του περιβάλλοντος (Lappa et al.,2019; Papadaki et al.,2022).

Η BCNW έχει υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού ,κρατά πάνω από εκατό φορές το βάρος της σε νερό .Αυτό, της δίνει την ικανότητα να υποστηρίζει και να ακινητοποιεί κύτταρα , όπως π.χ. προβιοτικά στελέχη, και να αξιολογεί τις προστατευτικές τους ιδιότητες. Εμφανίζει επίσης υψηλό βαθμό πολυμερισμού, υψηλό δείκτη κρυσταλλικότητας, μηχανική αντοχή σε δυνάμεις εφελκυσμού. Συγκριτικά με τη φυτική κυτταρίνη, το δίκτυο ινιδίων της BCNW είναι χημικά καθαρότερο (δεν χρειάζεται επεξεργασία για απομάκρυνση ημικυτταρινών και λιγνίνης) και πορώδες(επιτρέπεται η μεταφορά π.χ. προβιοτικών στο τρόφιμο) (Fijałkowski et al.,2015). Σύμφωνα με έρευνα των (Fijałkowski et al.,2016), αποδείχθηκε ότι η BCNW έχει την ικανότητα να λειτουργεί ως μήτρα για την ενθυλάκωση προβιοτικών , προστατεύοντάς τα από γαστρικά υγρά και χολικά άλατα. Μάλιστα το 2020 διεξήχθη η πρώτη έρευνα στην οποία αναφέρεται η ανάπτυξη προβιοτικών μεμβρανών με βάση τη BC. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι οι μεμβράνες παρουσίασαν καλές ιδιότητες εφελκυσμού και φραγμού παρέχοντας σταθερότητα στη βιωσιμότητα των προβιοτικών (Oliveira-Alcântara et al., 2020)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

2. ΣΚΟΠΟΣ

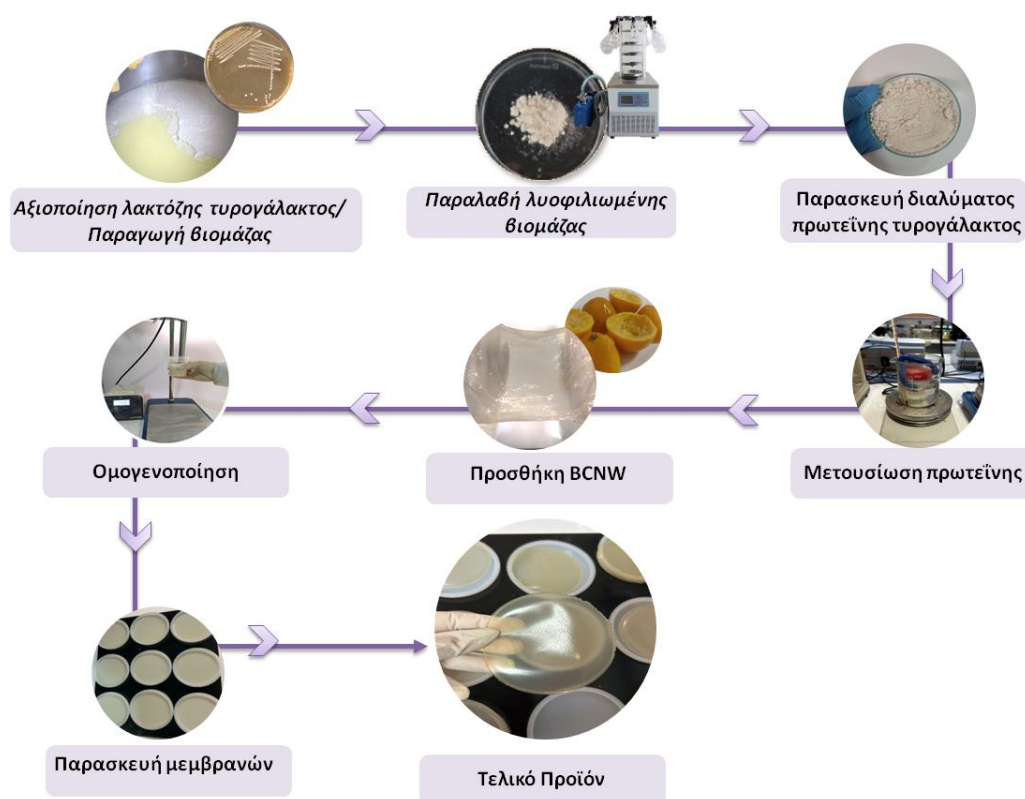
Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας η οποία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων και Βιομηχανικών Ζυμώσεων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ιονίου Πανεπιστημίου είναι:

- Η πλήρης αξιοποίηση του τυρογάλακτος για την παραγωγή εδώδιμων μεμβρανών αλλά και για την παραγωγή κυτταρικής βιομάζας, ωφέλιμων για την υγεία, γαλακτικών βακτηρίων
- Η παραγωγή λυοφιλωμένων κυττάρων και η επιλογή κατάλληλου κρυοπροστατευτικού υλικού για τα γαλακτικά βακτήρια *L. plantarum* F_254 κατά τη λυοφιλίωση
- Η ανάπτυξη εδώδιμων μεμβρανών οι οποίες δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως προστατευτικοί φορείς εγκλωβισμού των γαλακτικών βακτηρίων *L. plantarum* F_254
- Η επίδραση της εδώδιμης μεμβράνης στη βιωσιμότητα των εγκλωβισμένων γαλακτικών βακτηρίων *L. plantarum* F_254
- Η μελέτη της προσθήκης διαφορετικών συγκεντρώσεων της βακτηριακής νανοκυτταρίνης στην εδώδιμη μεμβράνη και η επίδραση στη βιωσιμότητα του *L. plantarum* F_254
- Συνολική εκτίμηση της καταλληλότητας των εδώδιμων μεμβρανών για την προστασία και τη διατήρηση της βιωσιμότητας του *L. plantarum* F_254 σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα έρευνα αξιοποιήθηκαν συστατικά του τυρογάλακτος για την παραγωγή εδώδιμων μεμβρανών στο πλαίσιο της κυκλικής βιοοικονομίας και της μηδενικής παραγωγής απορριμμάτων. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη τυρογάλακτος για τη παραγωγή εδώδιμων μεμβρανών, ενώ για την παραγωγή βιομάζας του στελέχους που ενθυλακώθηκε στις μεμβράνες αυτές χρησιμοποιήθηκε επίσης τυρόγαλα ως υπόστρωμα (κατανάλωση λακτόζης για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού). Με αυτόν τον τρόπο, αφενός μειώθηκε το κόστος παραγωγής των εδώδιμων μεμβρανών και αφετέρου απαλλάχθηκε το περιβάλλον από ένα απόβλητο, που όπως θα αναλυθεί παρακάτω είναι ο κυριότερος ρύπος της βιομηχανίας γάλακτος. Μάλιστα το τελικό προϊόν είναι δυνατό να μπορέσει να αξιοποιηθεί σε εφαρμογές που σχετίζονται με προϊόντα γαλακτοκομικών προϊόντων, δημιουργώντας καινοτόμες εφαρμογές που πλαισιώνουν απόλυτα το φάσμα την κυκλικής βιοοικονομίας.



Εικόνα 3.1: Πορεία παραγωγής βιολειτουργικών εδώδιμων μεμβρανών

3.1 Βιολογικό υλικό

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στη συλλογή του Ιονίου Πανεπιστημίου με κωδική ονομασία F_254 για το *Lactiplantibacillus plantarum*. Φυλάσσονται σε κρυοφιαλίδια (cryovials) των 2 mL στους -80 °C σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS (De Man Rogosa and Sharpe Agar), εμπλουτισμένο με 20% γλυκερόλη το οποίο είχε υποστεί αποστείρωση (121 °C, 20 λεπτά). Πριν τη χρήση του, η καθαρότητα των καλλιεργειών εξακριβώθηκε με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς σε τρυβλίο petri με θρεπτικό υπόστρωμα MRS από όπου λήφθηκε μοναδική αποικία για την παρασκευή των προκαλλιεργειών σε MRS broth.

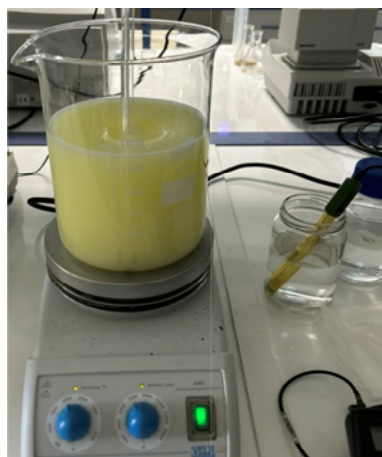
Για τη παραγωγή βακτηριακής νανοκυτταρίνης χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973, το οποίο έχει αγοραστεί από τη DSMZ-Γερμανική συλλογή μικροοργανισμών και κυτταρικών καλλιεργειών.

3.2 Παραγωγή βιομάζας

3.2.1 Προετοιμασία τυρογάλακτος για παραγωγή βιομάζας

Το τυρόγαλα που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για τη παραγωγή βιομάζας δέχθηκε επεξεργασία έτσι ώστε να απομακρυνθεί η πρωτεΐνη που έχει παραμείνει σε αυτό μετά τη διαδικασία της τυροκόμησης και την παραγωγή της μυζήθρας.

Το τυρόγαλα, θερμάνθηκε σε ποτήρι ζέσεως στους 55-60°C υπό ανάδευση, και έπειτα ρυθμίστηκε το pH=10 με τη προσθήκη NaOH 5M. Μετά τη πάροδο 3 λεπτών, ρυθμίστηκε το pH =3.5 με τη προσθήκη HCl 5M και τέλος μετά από 5 λεπτά ακολούθησε ρύθμιση του pH =5. Το τυρόγαλα μεταφέρθηκε σε φιάλες Duran και υπέστη θέρμανση 121°C για 20 λεπτά. Οι πρωτεΐνες που κατακρημνίστηκαν απομακρύνθηκαν με διήθηση υπό κενό, ακολούθησε αποστείρωση (121°C για 20 λεπτά) και το αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα, χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βιομάζας, όπως αναφέρεται παρακάτω.



α



β

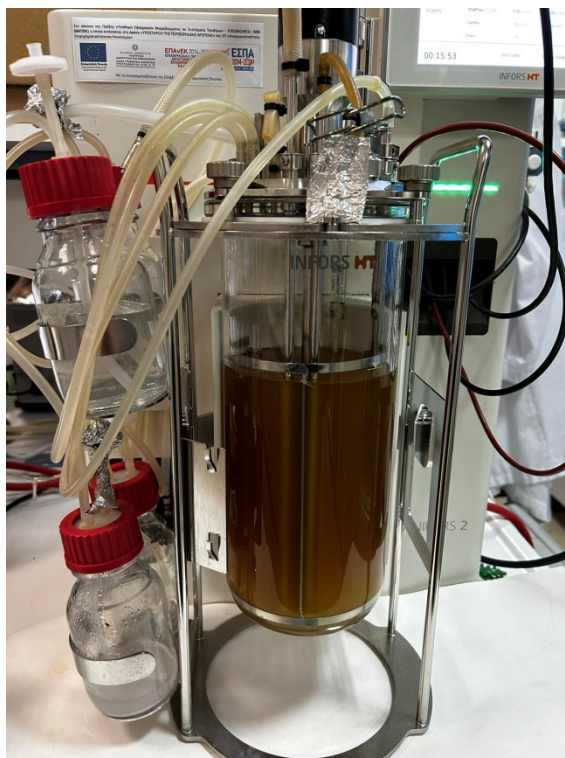
Εικόνα 3.2: α) Διαδικασία κατακρήμνισης πρωτεϊνών τυρογάλακτος, β) Διήθηση τυρογάλακτος υπό κενό

3.2.2 Ζύμωση γαλακτικών βακτηρίων σε βιοαντιδραστήρα για την παραγωγή βιομάζας

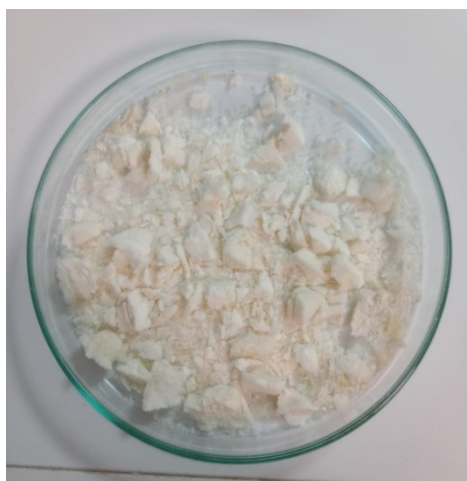
Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα όγκου 2 L (Infors) σε υπόστρωμα αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος, αξιοποιώντας τη λακτόζη αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος ως πηγή άνθρακα. Σε πρώτο στάδιο παρασκευάστηκαν οι προκαλλιέργειες σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS Broth, οι οποίες μετά τον εμβολιασμό επώαστηκαν στους 37°C για 14-16 ώρες.

Μετά την πλήρωση του βιοαντιδραστήρα με το τυρόγαλα, ακολούθησε αποστείρωση (121°C για 20 λεπτά). Κατά τη ζύμωση η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 37°C και η ανάδευση στα 150 rpm. Η διεργασία έγινε υπό αναερόβιες συνθήκες ενώ κατά τη διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιούνταν ρύθμιση του pH=6,7 με τη προσθήκη NaOH 5M, με χρήση αντλίας.

Μετά το πέρας 24^{ωv} ωρών ζύμωσης, ακολούθησε φυγοκέντρωση (4000 rpm, 4°C για 15 λεπτά). Τα κύτταρα διαχωρίστηκαν από το υπερκείμενο, το οποίο απορρίφθηκε. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με αποστειρωμένο PBS (Phosphate Buffer Saline, pH=7). Τέλος, προστέθηκε εκάστοτε κρυοπροστατευτικό υλικό σε αναλογία 1:10 (κρυοπροστατευτικό υλικό: όγκος ζύμωσης) και ακολούθησε απομάκρυνση της υγρασίας μέσω ξήρανσης υπό κατάψυξη (λυοφιλίωση).



Εικόνα 3.3: Ζύμωση του στελέχους *L. plantarum* (F_254) σε βιοαντιδραστήρα κλειστού τύπου και υπόστρωμα αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος



Εικόνα 3.4: Λυοφιλωμένη βιομάζα του στελέχους *L. plantarum* (F_254)

3.3 Παραγωγή λυοφιλωμένων κυττάρων με χρήση κρυοπροστατευτικού υλικού
Για την επιλογή κατάλληλου κρυοπροστατευτικού υλικού εξετάστηκε το τυρόγαλα (CW), το αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα (CWd), η πρωτεΐνη τυρογάλακτος (W1%) καθώς και η μη προσθήκη κάποιου υλικού. Παράχθηκε βιομάζα του F_254 όπως θα

περιγραφεί παρακάτω και στη συνέχεια τα κύτταρα ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν μέσα σε γυάλινους σωλήνες. Το εκάστοτε κρυοπροστατευτικό υλικό προστέθηκε σε αναλογία 1:10. Ακολούθησε λυοφιλίωση και plating. Μετά τη λυοφιλίωση, τα κύτταρα ζυγίστηκαν και αραιώθηκαν με Ringer (10^{-1}) και επαναλήφθηκε plating.

3.4 Ζύμωση την παραγωγή βακτηριακής νανοκυτταρίνης (BCNW)

Αρχικά αξιοποιήθηκαν υδατικά εκχυλίσματα από φλούδες πορτοκαλιών ως υπόστρωμα για τη ζύμωση προς παραγωγή βακτηριακής νανοκυτταρίνης, με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973. Στη συνέχεια, αφού η βακτηριακή κυτταρίνη καθαρίστηκε και κόπηκε σε μικρά κομμάτια (1x1), πραγματοποιήθηκε όξινη υδρόλυση με διάλυμα H_2SO_4 5 M στους 50 °C για 48 ώρες, χρησιμοποιώντας συγκέντρωση BCNW 7 g/L. Ακολούθησε φυγοκέντρωση του διαλύματος σε 4000 rpm σε θερμοκρασία 15 °C για 15 λεπτά, ώστε να ληφθεί ένα όξινο λευκό ίζημα, το οποίο πλύθηκε επανειλημμένα με απιονισμένο νερό. Το υδατικό διάλυμα BCNW ουδετεροποιήθηκε με τη προσθήκη 0,5 M NaOH. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση και το τελικό λευκό και μερικώς ενυδατωμένο ίζημα BCNW αποθηκεύτηκε στους 5 °C, μέχρι περαιτέρω χρήση (Papadaki et al., 2022)



Εικόνα 3.5: Βακτηριακή νανοκυτταρίνη πριν και μετά την έκπλυση

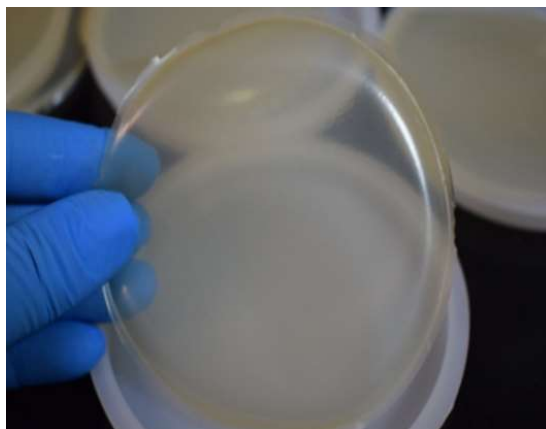
3.5 Διαδικασία παρασκευής εδωδιμων μεμβρανών από πρωτεΐνη τυρογάλακτος

Για την παραγωγή εδωδιμων μεμβρανών παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης τυρογάλακτος με περιεκτικότητα 7% w/w. Η πρωτεΐνη ενυδατώθηκε σε απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες υπό ανάδευση σε

πλαστικό περιέκτη. Ακολούθησε η προσθήκη βακτηριακής νανοκυτταρίνης (BCNW) σε συγκέντρωση 5 ή 10% w/w επί της πρωτεΐνης και έγινε χρήση υπερήχων ώστε να κατανεμηθεί ομοιόμορφα στο διάλυμα.

Για την παραγωγή των μεμβρανών απαιτείται μετουσίωση της πρωτεΐνης, η οποία πραγματοποιήθηκε με ρύθμιση του pH=8 (NaOH 0,5M) και θέρμανση του διαλύματος στους 80 °C υπό ανάδευση για 30 λεπτά. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, ο περιέκτης τοποθετήθηκε αμέσως σε θερμοκρασία 4 °C για να σταματήσει η διαδικασία της μετουσίωσης. Αφού ψύχθηκε το διάλυμα, προστέθηκε γλυκερόλη η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πλαστικοποιητής (40% w/w επί της πρωτεΐνης), και το διάλυμα ομογενοποιήθηκε με 3000 rpm και τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων (Sonica 2400 M S3, Soltec, Milano, Italy) για απαέρωση για τουλάχιστον 15 λεπτά. Για το σχηματισμό των μεμβρανών χρησιμοποιήθηκαν καλούπια από σιλικόνη με διάμετρο 9 εκατοστά και πληρώθηκαν με 9mL διαλύματος το κάθε ένα. Στη συνέχεια τα καλούπια μεταφέρθηκαν σε θάλαμο με ελεγχόμενη θερμοκρασία και υγρασία, 25 ± 2 °C και RH $55 \pm 5\%$ για 24 ώρες ,αντιστοίχως. Στην περίπτωση που οι μεμβράνες αποτέλεσαν το φορέα ενθυλάκωσης των γαλακτικών βακτηρίων, η προσθήκη της λυοφιλωμένης καλλιέργειας κυττάρων, προστέθηκε μετά την απαέρωση του διαλύματος στους υπερήχους και ακολούθησε ήπια ομογενοποίηση.

Οι μεμβράνες που παρασκευάστηκαν αποθηκεύτηκαν σε δύο διαφορετικές συνθήκες, στους 4 °C και στους 25°C , ώστε να μελετηθεί η βιωσιμότητα των γαλακτικών βακτηρίων σε διάστημα 90 ημερών προσομοιάζοντας τις συνθήκες αποθήκευσης υπό ψύξη και τις συνθήκες αποθήκευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ως μάρτυρες της εκάστοτε ανάλυσης, χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες που δεν περιείχαν BCNW ή/και καλλιέργεια λυοφιλωμένων κυττάρων.



Εικόνα 3.6: Εδωδισες μεμβράνες από πρωτεΐνη τυρογάλακτος

3.6 Προσδιορισμός μικροβιακού πληθυσμού

Για να προσδιοριστεί ο μικροβιακός πληθυσμός μιας εδώδιμης μεμβράνης, έγινε δειγματοληψία 3 φορές σε διάστημα 90 ημερών (1 φορά/μήνα). Η μεμβράνη τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια και επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) με αναλογία 1/10. Τοποθετήθηκε στους 37°C για 1 ώρα. Μετά τη πάροδο του χρόνου, το δείγμα αραιώθηκε διαδοχικά. Τέλος, έγινε εμβολιασμός σε τρυβλία με συνθετικό υπόστρωμα MRS agar, και μεταφέρθηκαν για επώαση στους 37°C για 48 ώρες. Μετά τις 48 ώρες πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση. Το ποσοστό βιωσιμότητας του βακτηρίου υπολογίστηκε από την εξίσωση (Soukoulis et al., 2017).

$$\% \text{Βιωσιμότητα} = \frac{N}{N_0}$$

Όπου, N_0 : μικροβιακός πληθυσμός πριν την ξήρανση/αποθήκευση (log CFU/g)

N : μικροβιακός πληθυσμός μετά την ξήρανση/ αποθήκευση (log CFU/g)



Εικόνα 3.7: Καταμέτρηση αποικιών για τον προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού

3.7 Ιδιότητες εδώδιμων μεμβρανών

Πάχος

Για τη μέτρηση του πάχους των μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε το παχύμετρο (YATO TOOLS (Shanghai) Co., Ltd, China) με ακρίβεια 0,002 mm. Το πάχος της κάθε μεμβράνης μετρήθηκε σε 5 σημεία. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για το κάθε είδος μεμβρανών ώστε τα αποτελέσματα να είναι ακριβή και αντιπροσωπευτικά. Ο μέσος όρος πάχους της κάθε μεμβράνης υπολογίστηκε από την εξίσωση :

$$\text{Πάχος} = \frac{\text{Άθροισμα Πάχους Των 5 Σημείων}}{5}$$

Υγρασία

Η περιεχόμενη υγρασία κάθε μεμβράνης μετρήθηκε με τη μέθοδο . Αρχικά κόπηκαν 3 ομοιόμορφα κομμάτια μήκους (2cm x 2cm) από κάθε μεμβράνη. Ζυγίστηκε το βάρος του κάθε κομματιού με ακρίβεια και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε φούρνο (UNB400, Memmert, Germany) στους 60 °C για ξήρανση έως ότου σταθεροποιηθεί το βάρος τους. Τα κομμάτια ζυγίστηκαν μετά τη ξήρανση και η περιεχόμενη υγρασία υπολογίστηκε από την εξίσωση

$$\% \text{Υγρασία} = \frac{\text{Αρχικό Βάρος} - \text{Τελικό Βάρος}}{\text{Τελικό Βάρος}} \times 100$$

Διαλυτότητα

Για να προσδιοριστεί η διαλυτότητα των μεμβρανών ακολουθήθηκε η μέθοδος των των Galus και Kadzinska (2016).Επαναλήφθηκε ο τεμαχισμός τους σε 3 ίδια κομμάτια (μήκους 2 εκατοστών και πλάτους 1 εκατοστού), ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε περιέκτη με 30mL απιονισμένο νερό για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια ακολούθησε ξήρανση και ζύγιση. Η διαλυτότητα υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$\% \text{ Διαλυτότητα} = \frac{\text{Αρχικό βάρος} - \text{Τελικό βάρος}}{\text{Τελικό βάρος}} \times 100$$

Διαπερατότητα Υδρατμών (WVP)

Για τη μέτρηση της διαπερατότητας υδρατμών των μεμβρανών χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα βαζάκια (3,7 cm διάμετρος στομίου × 5,5 cm ύψος), τα οποία πληρώθηκαν με silica gel(40g) αφήνοντας κενό 1cm μεταξύ του silica gel και του στομίου. Πάνω στο στόμιο σφραγίστηκαν με σιλικόνη οι μεμβράνες .Τα βαζάκια αφού ζυγίστηκαν τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό θάλαμο κορεσμένο με διάλυμα νιτρικού μαγνησίου με RH 50 ± 5% σε θερμοκρασία 25°C για 96 ώρες. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση βάρους για κάθε βαζάκι, κάθε 4 ώρες. Η διαπερατότητα των μεμβρανών υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$WVP = \frac{WVTR \times x}{\Delta p}$$

Όπου WVTR (g/m² d) είναι η κλίση (g/d) διαιρούμενη με την περιοχή μεταφοράς του φιλμ (m² x (mm) είναι το πάχος της μεμβράνης και Δp (kPa) είναι η μερική πίεση νερού-ατμών (1,6 kPa) κατά μήκος της μεμβράνης.



Εικόνα 3.8: Προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό της διαπερατότητας υδρατμών

Οπτικές ιδιότητες

Για αυτή τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες οι οποίες αφού τεμαχίστηκαν ομοιόμορφα όπως προαναφέρθηκε, και μετρήθηκε και το πάχος τους, τοποθετήθηκαν στην εσωτερική πλευρά μιας κυψελίδας. Η διαφάνεια των μεμβρανών μετρήθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Helios Omega, ThermoScientific, USA) σε εύρος μήκος κύματος 280–800 nm και υπολογίστηκε με την εξίσωση :

$$\text{Οπτική Πυκνότητα} = \frac{\log\left(\frac{1}{T_{600}}\right)}{x}$$

Όπου T_{600} είναι %T στα 600 nm και x το πάχος της μεμβράνης (mm)

Μία άδεια κυψελίδα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (Papadaki et al., 2022)

Ικανότητα συγκράτησης νερού (ΙΣΝ)

Για τη μέτρηση ικανότητας συγκράτησης νερού, 3 μεμβράνες, με γνωστό βάρος και συγκεκριμένες διαστάσεις (4x1cm), εμβαπτίστηκαν ξεχωριστά σε 50 mL απιονισμένο νερό για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, αφού απομακρύνθηκε η περιττή υγρασία, ζυγίστηκαν ξανά. Για τον υπολογισμό της ικανότητας συγκράτησης νερού, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{ΙΣΝ} = \frac{\text{Τελικό Βάρος} - \text{Αρχικό Βάρος}}{\text{Αρχικό Βάρος}} \times 100$$

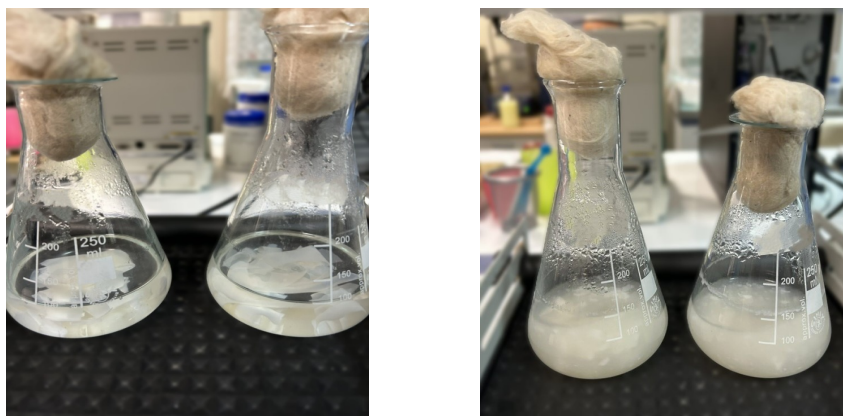
3.8 Απελευθέρωση γαλακτικών βακτηρίων σε διαλύματα προσομοίωσης τροφίμων (Food Simulants)

Οι εδώδιμες μεμβράνες που παρασκευάστηκαν με ενθυλακωμένο το στέλεχος F_254 τοποθετήθηκαν μέσα σε υδατικά διαλύματα προσομοιωτών τροφίμων, με σκοπό τη μέτρηση βιωσιμότητας του βακτηρίου. Χρησιμοποιήθηκαν δύο υδατικά διαλύματα:

- i) 3%ν/ν οξικό οξύ (προσομοίωση τροφίμων με υδρόφιλο και όξινο χαρακτήρα)
- ii) Νερό

(Table 1 ANEX III Commission Regulation EU 10/2011)

100 mL κάθε διαλύματος τοποθετήθηκαν μέσα σε κωνικές φιάλες με μία μεμβράνη, και ανακινήθηκαν σε Heidolph Vibramax 100 σε 300 rpm για 48 ώρες. Παράλληλα, πραγματοποιούνταν δειγματοληψία (κάθε 2-4 ώρες) και το κάθε δείγμα κι αφού αραιώθηκε κατάλληλα σε PBS ακολούθησε καταμέτρηση των απελευθερωμένων αποικιών σε MRS agar στους 37 °C για 48-72 ώρες.



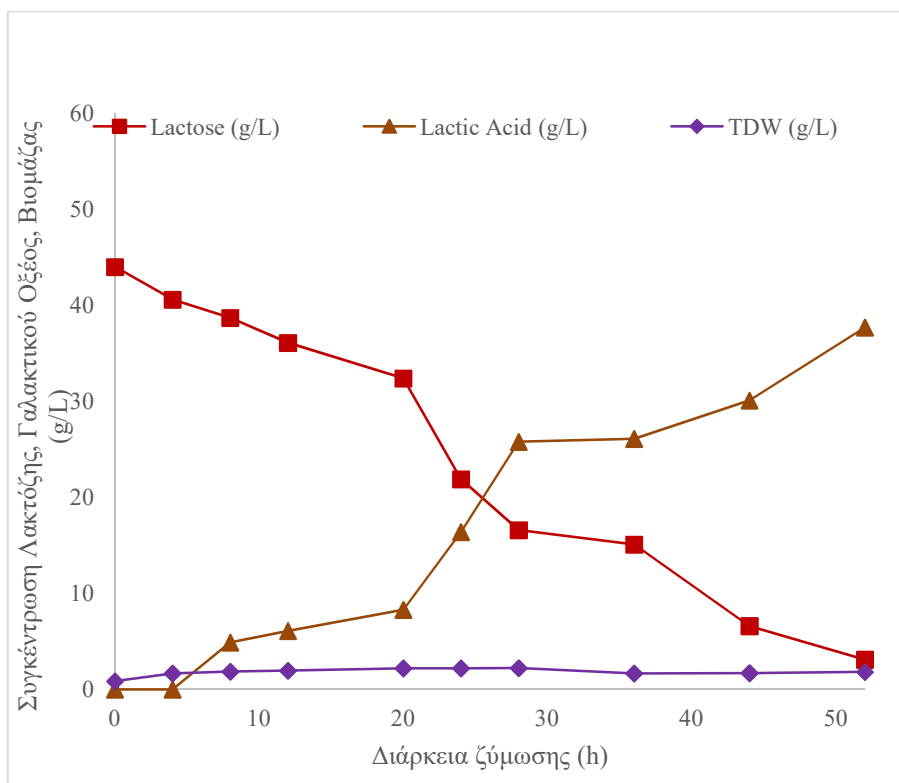
Εικόνα 3.9: Απελευθέρωση γαλακτικού βακτηρίου σε υδατικά διαλύματα προσομοιωτών τροφίμων, νερό και οξικό οξύ(3%) τη χρονική στιγμή T2 και T6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Παραγωγή βιομάζας γαλακτικού βακτηρίου F_254

Στο Γράφημα 1 απεικονίζεται η πορεία κατανάλωσης της λακτόζης του υποστρώματος, η παραγωγή γαλακτικού οξέος και βιομάζας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Παρατηρείται ότι η ποσότητα λακτόζης στην αρχή της ζύμωσης ήταν 45 g/L, ποσότητα που κρίνεται ικανοποιητική για τη πραγματοποίηση της ζύμωσης, και καταναλώθηκε πλήρως μετά από 50 ώρες. Η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος μέχρι το τέλος της ζύμωσης στις 52 ώρες ήταν 38 g/L, ενώ το ολικό ξηρό βάρος της παραγόμενης βιομάζας ήταν 1,25 g/L.

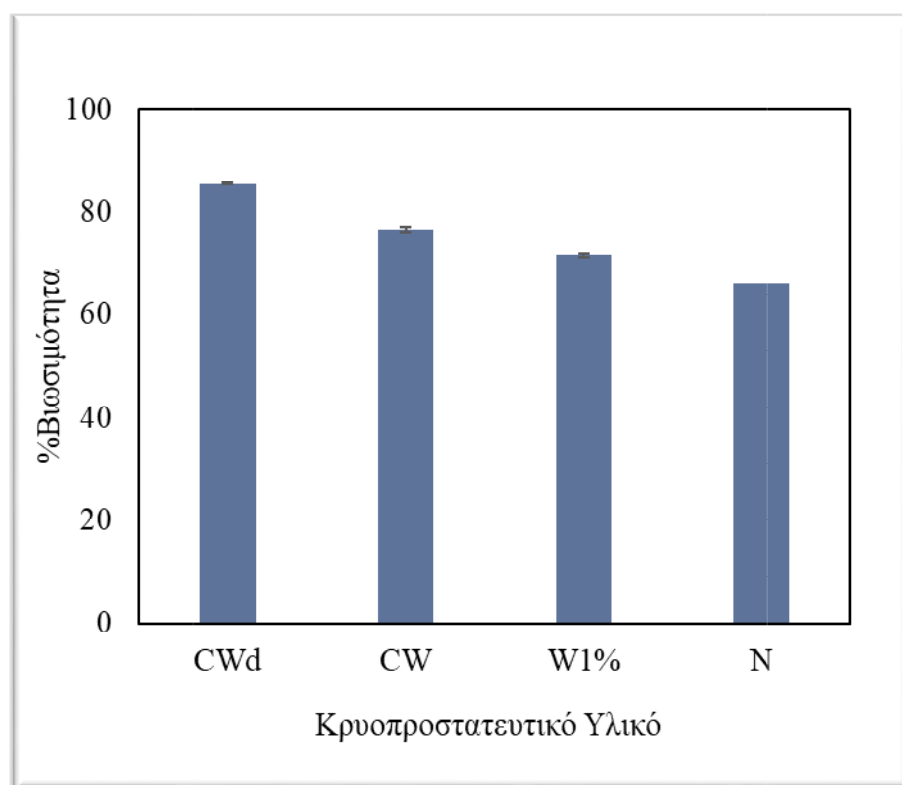


Γράφημα 4.1: Ζύμωση για παραγωγή βιομάζας γαλακτικού βακτηρίου F_254 με υπόστρωμα αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος

4.2 Επιλογή κατάλληλου κρυοπροστατευτικού υλικού

Η διαδικασία της λυοφιλίωσης παρόλο που κρίνεται χρήσιμη για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του μικροοργανισμού αλλά και για την ευκολότερη αξιοποίηση της τεχνολογίας αυτής σε επόμενες εφαρμογές, παρατηρείται πως προκαλεί μείωση στη

βιωσιμότητα του μικροοργανισμού. Για το σκοπό αυτό, κρίνεται αναγκαία η χρήση διαφόρων υλικών τα οποία δρουν ως κρυοπροστατευτικοί παράγοντες για την διασφάλιση του πληθυσμού του μικροοργανισμού (Bodgen et al., 2021). Στη παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση προσθήκης τυρογάλακτος (παραγόμενο μετά τη διαδικασία της παραγωγής μυζήθρας) (CW), αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος (CWd) καθώς και συμπυκνωμένης πρωτεΐνης τυρογάλακτος με ποσοστό καθαρότητας >80% (W1%). Επιπλέον, η διαδικασία της λυοφιλίωσης εφαρμόστηκε και σε κύτταρα στα οποία δεν έγινε προσθήκη κρυοπροστατευτικού υλικού (N) ώστε να χρησιμοποιηθούν ως δείγματα ελέγχου και να αξιολογηθεί η αναγκαιότητα προσθήκης κρυοπροστατευτικού υλικού. Στο Γράφημα 2, απεικονίζεται η επίδραση του κάθε κρυοπροστατευτικού υλικού στη βιωσιμότητα του στελέχους *L. plantarum* (F_254) μετά τη διαδικασία της λυοφιλίωσης.



Γράφημα 4.2: Επίδραση κρυοπροστατευτικού υλικού στη βιωσιμότητα του στελέχους *L. plantarum* (F_254) μετά τη λυοφιλίωση

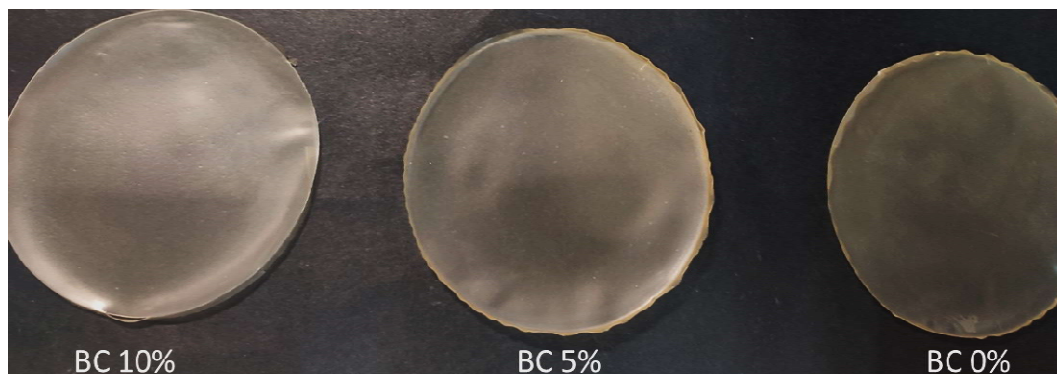
Παρατηρείται, ότι το μικρότερο ποσοστό διατήρησης της βιωσιμότητας είναι 66% και εμφανίζεται στην περίπτωση που δεν έχει γίνει προσθήκη κάποιου κρυοπροστατευτικού υλικού. Η προσθήκη W1% εμφάνισε ποσοστό βιωσιμότητας

72%, ενώ η προσθήκη τυρογάλακτος 77%. Το μεγαλύτερο ποσοστό βιωσιμότητας παρουσιάστηκε με τη προσθήκη αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος, με αυτό να ανέρχεται στο 85%. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η χρήση κρυοπροστατευτικού υλικού είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του συγκεκριμένου στελέχους. Σε αντίστοιχη μελέτη των Bodgen et al., 2021, επιβεβαιώνεται η αναγκαιότητα προσθήκης κρυοπροστατευτικών υλικών κατά τη διαδικασία της λυοφιλίωσης αφού με τον τρόπο αυτό η βιωσιμότητα του μικροοργανισμού παρέμεινε σε πληθυσμό της τάξης των 10 log CFU/g.

Ως εκ τούτου, τα επόμενα πειράματα ανάπτυξης εδώδιμων μεμβρανών με ενθυλάκωση του βακτηριακού στελέχους F_254 πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση λυοφιλωμένων κυττάρων με αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα ως κρυοπροστατευτικό υλικό.

4.3 Ανάπτυξη Εδώδιμων μεμβρανών και μελέτη φυσικών ιδιοτήτων

Η προσθήκη των λυοφιλωμένων κυττάρων στις εδώδιμες μεμβράνες πραγματοποιήθηκε με επιτυχία καθώς παραλήφθηκαν συνεκτικές μεμβράνες χωρίς εμφανείς μακροσκοπικές αλλαγές σε σχέση με τη μεμβράνη ελέγχου (BCNW 0%).



Εικόνα 4.1 : Εδώδιμες μεμβράνες από πρωτεΐνη τυρογάλακτος με διαφορετικές συγκεντρώσεις BCNW

Οι εδώδιμες μεμβράνες είναι ωφέλιμο να διαθέτουν καλές φυσικές και μηχανικές ιδιότητες, ώστε να μπορούν να ανταπεξέλθουν στην καταπόνηση που μπορεί να δεχθούν κατά τη διαδικασία επεξεργασίας, συσκευασίας και συντήρησης/αποθήκευσης (Soukoulis et al., 2017). Ως εκ τούτου, σε αυτό το

κεφάλαιο παρουσιάζεται η μελέτη μελετήθηκαν των εξής ιδιοτήτων: πάχος, υγρασία, διαλυτότητα σε νερό, διαπερατότητα υδρατμών και ικανότητα συγκράτησης νερού.

Στο Γράφημα 4.3 απεικονίζεται το πάχος των μεμβρανών για τη κάθε περίπτωση προσθήκης βακτηριακής νανοκυτταρίνης (BCNW 0%, 5% και 10%), στο οποίο παρατηρείται ότι οι εδωδιμες μεμβράνες και των τριών περιπτώσεων είχαν παρόμοιο πάχος. Στις μεμβράνες στις οποίες έγινε προσθήκη BCNW 5% και 10% το πάχος ήταν $0,15 \text{ mm} \pm 0,02$ και $0,15 \text{ mm} \pm 0,05$, αντιστοίχως, ενώ στην περίπτωση BCNW 0% το πάχος ήταν $0,14 \text{ mm} \pm 0,02$.

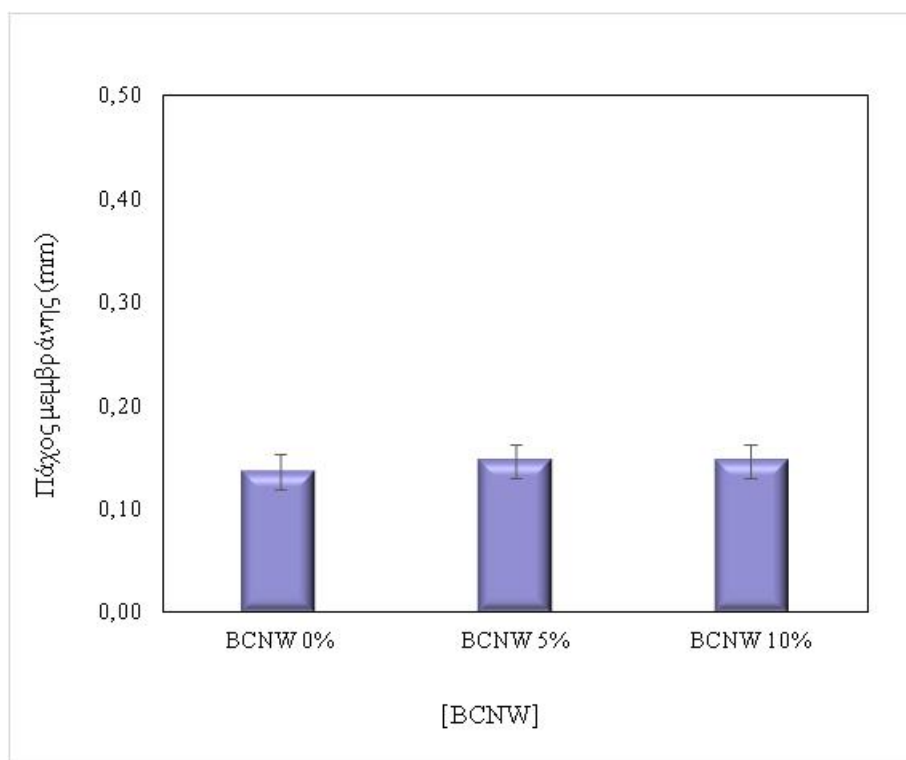
Σε ό,τι αφορά την περιεχόμενη υγρασία (Γράφημα 12), συμπεραίνουμε ότι οι μεμβράνες οι οποίες δεν περιείχαν BCNW είχαν μικρότερο ποσοστό υγρασίας ($12,4\% \pm 0,4$) από αυτές στις οποίες έγινε προσθήκη BCNW 5% και 10% ($13,8\% \pm 0,3$ και $15,1\% \pm 0,5$ αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα, καθώς γνωρίζουμε ότι η BCNW έχει υδρόφιλο χαρακτήρα και η προσθήκη της στις μεμβράνες πιθανόν επηρέασε την αλληλεπιδράσεις με το νερό.

Όσον αφορά τη διαλυτότητα των μεμβρανών, παρατηρείται στο Γράφημα 13 ότι η περίπτωση BCNW 0% είναι χαμηλότερη (55%) από την περίπτωση BCNW 5% (57%) και BCNW 10% (57%). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως οι μεμβράνες που εμπλουτίστηκαν με BCNW είχαν χαμηλότερη διαλυτότητα στο νερό, πιθανότατα λόγω των αυξημένων στερεών υλικών (προσθήκη BCNW).

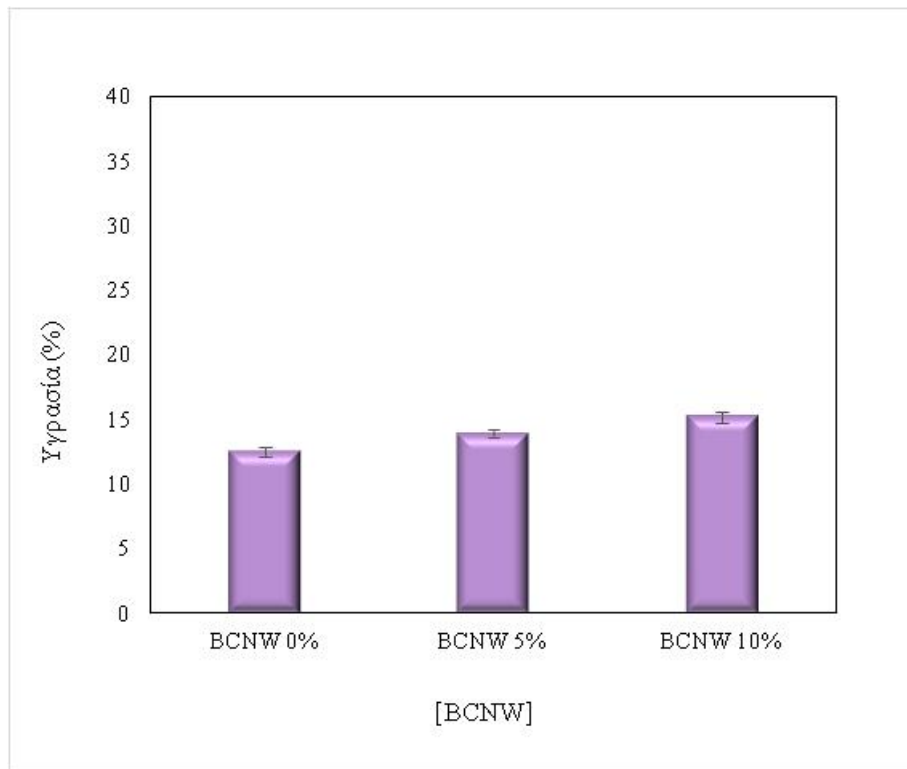
Από το Γράφημα 14 προκύπτει ότι οι εδωδιμες μεμβράνες χωρίς προσθήκη BCNW παρουσίασαν τη χαμηλότερη ικανότητα συγκράτησης νερού ($77\% \pm 2,0$). Ακολούθως οι μεμβράνες με προσθήκη BCNW 5% και 10% είχαν ικανότητα συγκράτησης νερού ίση με $87\% \pm 1,0$ και $91\% \pm 0,3$, αντίστοιχα. Σε αυτή την περίπτωση θα μπορούσε να ισχύει ότι η αυξημένη προσθήκη ενός υδρόφιλου υλικού ενίσχυσε την απορρόφηση περισσότερης ποσότητας νερού κι έτσι αύξησε την ικανότητα συγκράτησης νερού των μεμβρανών.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η διαπερατότητα υδρατμών (Γράφημα 15) εμφάνισε τη χαμηλότερη τιμή στη περίπτωση BCNW 0%, με αυτή να είναι $0,16 \text{ g mm/m}^2 \text{ h kPa} \pm 0,04$. Στη περίπτωση BCNW 5% $0,2 \pm 0,01 \text{ mm/m}^2 \text{ h kPa}$, ενώ στη περίπτωση BCNW 10% $0,25 \pm 0,08 \text{ mm/m}^2 \text{ h kPa}$. Παρόλο που σε προηγούμενη μελέτη αναφέρεται ότι η προσθήκη βακτηριακής νανοκυτταρίνης προκαλεί μείωση της διαπερατότητας σε υδρατμούς των μεμβρανών από πρωτεΐνη τυρογάλακτος (Papadaki et al., 2022), η παρούσα μελέτη δείχνει αντίθετα αποτελέσματα. Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι προστέθηκαν ταυτόχρονα λυοφιλωμένα κύτταρα σε

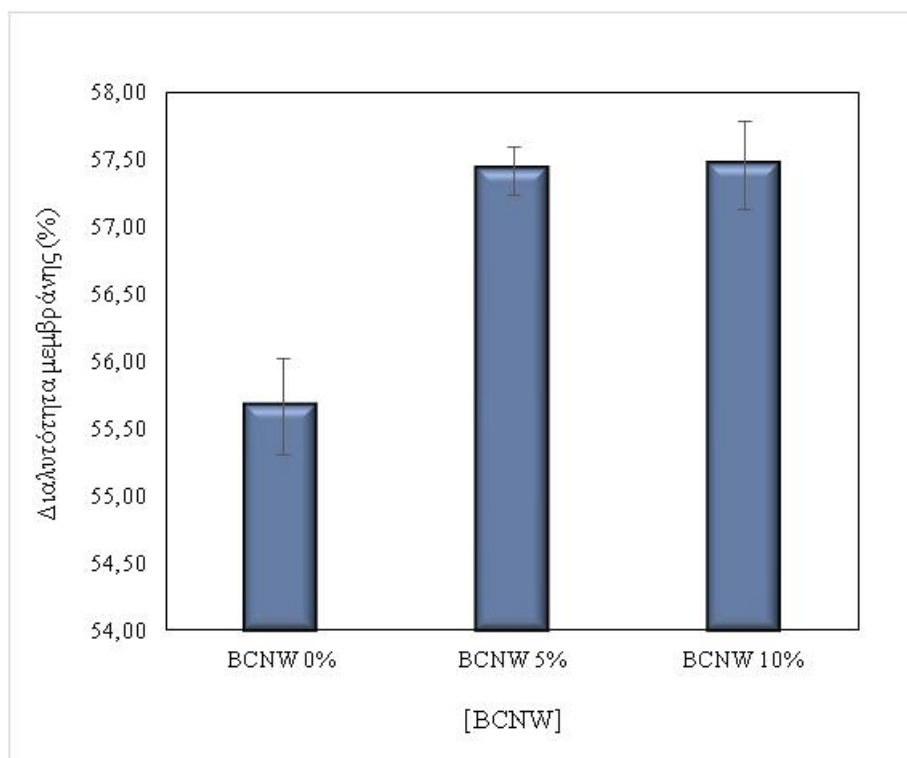
κρυοπροστατευτικό υλικό, το οποίο προφανώς έχει επηρεάσει με διαφορετικό τρόπο τις ιδιότητές της. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η περίπτωση ταυτόχρονης ενσωμάτωσης βακτηριακής νανοκυτταρίνης και αιθέριου ελαίου ρίγανης στις μεμβράνες από πρωτεΐνη τυρογάλακτος, οι οποίες δεν εμφάνισαν αντίστοιχη μείωση αυτής της ιδιότητας λόγω πρόκλησης αλλαγών στη δομή της μεμβράνης (Papadaki et al. 2024). Ως εκ τούτου, πιθανή αλλαγή της δομής στις μελετώμενες μεμβράνες δύναται να έχει συνεισφέρει σε αυτό το αποτέλεσμα.



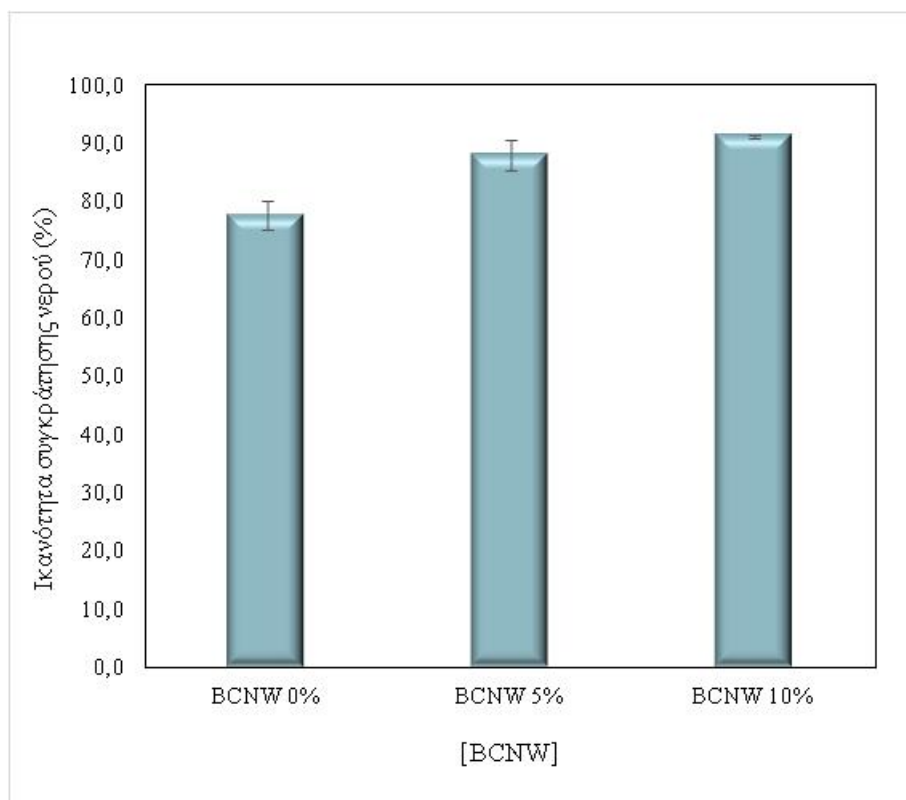
Γράφημα 4.3: Πάχος εδωδίων μεμβρανών με ενθυλακωμένο στέλεχος *L. plantarum* (F_254), και προσθήκη 0% ,5% και 10% BCNW



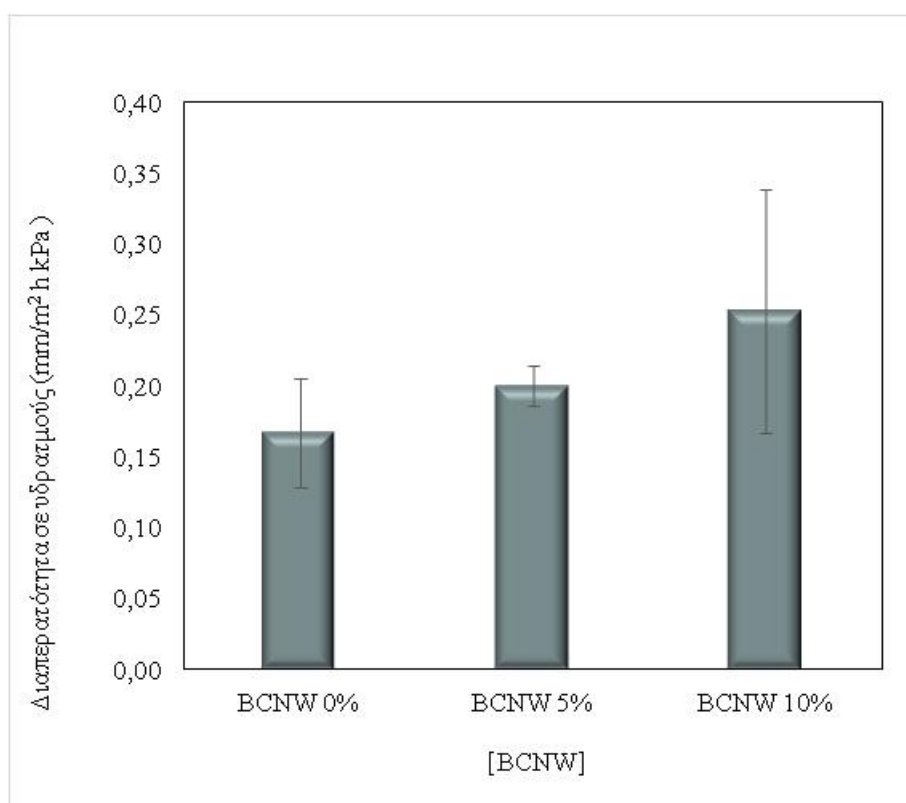
Γράφημα 4.4: Υγρασία (%) εδωδίων μεμβρανών με ενθυλακωμένο στέλεχος *L. plantarum* (F_254), και προσθήκη 0% ,5% και 10% BCNW



Γράφημα 4.5: Διαλυτότητα μεμβρανών(%) εδωδίων μεμβρανών με ενθυλακωμένο στέλεχος *L. plantarum* (F_254), και προσθήκη 0% ,5% και 10% BCNW



Γράφημα 4.6: Ικανότητα συγκράτησης νερού(%)εδώδιμων μεμβρανών με ενθυλακωμένο στέλεχος *L. plantarum* (F_254), και προσθήκη 0% ,5% και 10% BCNW



Γράφημα 4.7: Διαπερατότητα σε υδρατμούς εδώδιμων μεμβρανών με ενθυλακωμένο στέλεχος *L. plantarum* (F_254), και προσθήκη 0%, 5% και 10% BCNW

4.4 Επίδραση εγκλωβισμού σε εδώδιμες μεμβράνες και προσθήκης βακτηριακής νανοκυτταρίνης στη διατήρηση της βιωσιμότητας του *L. plantarum* (F_254)

4.4.1 Αποθήκευση στους 5 °C

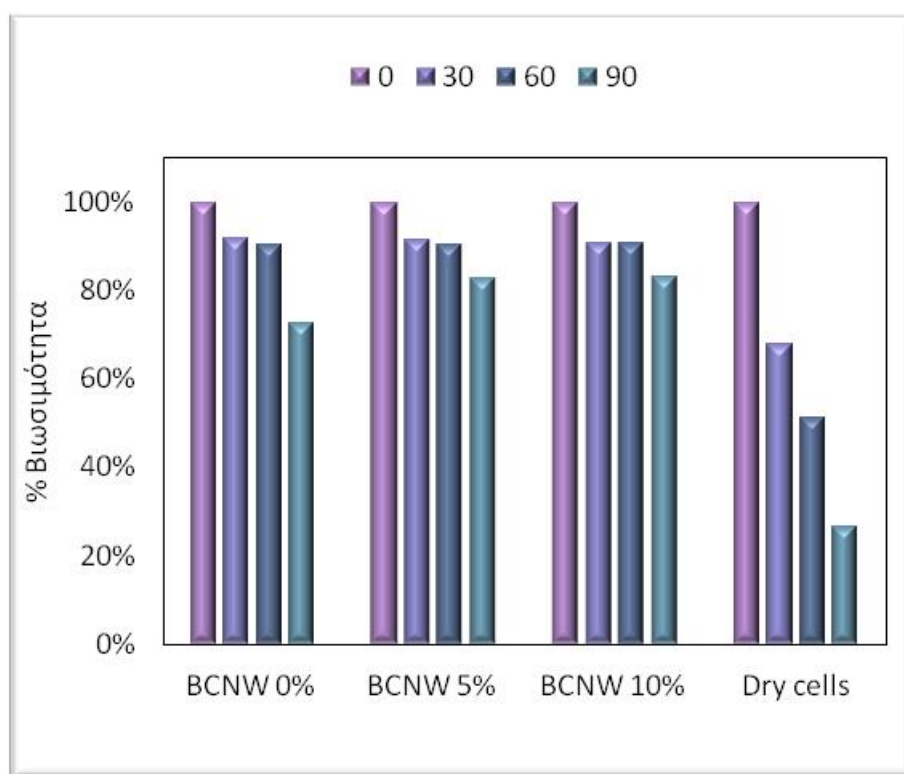
Σημαντική παράμετρος για την αξιοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων και κυρίως όσων παρουσιάζουν προβιοτικά χαρακτηριστικά είναι η διασφάλιση του απαιτούμενου πληθυσμού. Για το σκοπό αυτό είναι χρήσιμη η εύρεση υλικών και τεχνικών ενθυλάκωσης οι οποίες θα εξασφαλίσουν τον απαιτούμενο πληθυσμό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του μικροοργανισμού. Στην παρούσα μελέτη η τεχνική που μελετήθηκε είναι η ενθυλάκωση του στελέχους σε εδώδιμες μεμβράνες από πρωτεΐνη τυρογάλακτος, ενώ παράλληλα μελετήθηκε ξεχωριστά και η επίδραση της προσθήκης ενός επιπλέον βιοπολυμερούς της βακτηριακής νανοκυτταρίνης (BCNW). Για τη μελέτη αυτή, εξετάστηκαν οι παρακάτω περιπτώσεις, ώστε να αξιολογηθεί τόσο η διαδικασία της ενθυλάκωσης αλλά και η προσθήκη της BCNW στη διατήρηση της βιωσιμότητας του μικροοργανισμού σε διάστημα 90 ημερών και σε συνθήκες αποθήκευσης 5°C.

- i. Χωρίς προσθήκη BCNW (BCNW 0%)
- ii. Προσθήκη 5% BCNW επί της πρωτεΐνης (BCNW 5%)
- iii. Προσθήκη 10% BCNW επί της πρωτεΐνης (BCNW 10%)
- iv. Λυοφιλιωμένη καλλιέργεια (Dry cells) (ως μάρτυρες)

Στο Γράφημα 3 διακρίνεται πως η βιωσιμότητα του ενθυλακωμένου γαλακτικού βακτηρίου συγκριτικά με τα Dry cells παραμένει υψηλότερη καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης (90 ημέρες). Πιο συγκεκριμένα, στις 30 ημέρες η βιωσιμότητα των Dry cells είναι 24% χαμηλότερη από τη περίπτωση BCNW 0%. Στις επόμενες 30 ημέρες (60 ημέρες αποθήκευσης), το ποσοστό της βιωσιμότητας του στελέχους που έχει ενθυλακωθεί σε εδώδιμες μεμβράνες έχει παραμείνει στο 90%, ενώ η αντίστοιχη τιμή για τα ελεύθερα κύτταρα λυοφιλιωμένα κύτταρα είναι 51%. Τέλος, στις 90 ημέρες αποθήκευσης στους 5°C η βιωσιμότητα των Dry Cells έφτασε στο 26%, σε αντίθεση με τα ενθυλακωμένα βακτήρια στις μεμβράνες BCNW 0%, η βιωσιμότητα των οποίων διατηρήθηκε σε κατά 47% περισσότερο, παραμένοντας στο 73%. Συνεπώς, το πρώτο στάδιο της μελέτης επιβεβαιώνει πως ο μικροοργανισμός χρήζει της

εφαρμογής ενθυλάκωσης για τη διατήρηση της βιωσιμότητάς του και πως οι εδώδιμες μεμβράνες αποτελούν μια υποσχόμενη επιλογή.

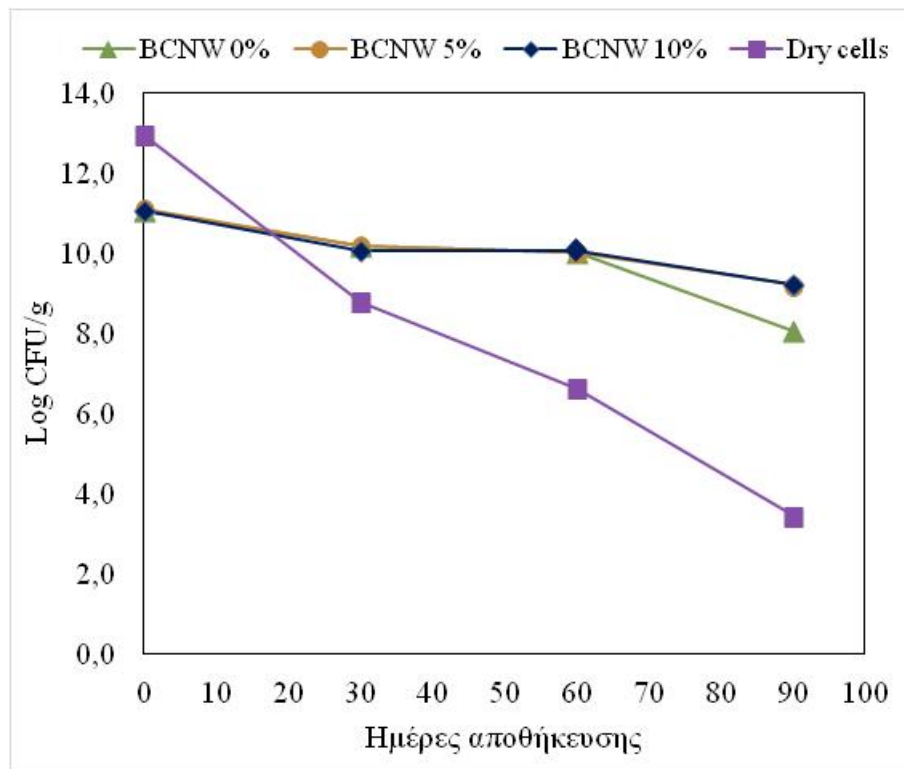
Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης BCNW στη βιωσιμότητα του στελέχους. Μελετήθηκε αρχικά η προσθήκη BCNW 5% και παρατηρήθηκε πως παρόλο που τα αποτελέσματα έως τις 60 ημέρες ήταν όμοια με αυτά της BCNW 0%, στις 90 ημέρες φαίνεται διαφοροποίηση 10% υπέρ των μεμβρανών με BCNW 5%. Επομένως, η προσθήκη BCNW 5% θεωρείται ωφέλιμη για τη βιωσιμότητα του F_254. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης BCNW (BCNW 10%), ώστε να εξερευνηθεί αν προκύπτουν ακόμη καλύτερα αποτελέσματα, αναφορικά με την βιωσιμότητα του στελέχους. Όπως όμως παρατηρείται και από το Γράφημα 3, δεν εμφανίζεται διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων συγκριτικά με τη μικρότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε (BCNW 5%) καθώς και στις δύο περιπτώσεις η βιωσιμότητα του μικροοργανισμού παρέμεινε στο 83%.



Γράφημα 4.8: Έλεγχος της βιωσιμότητας του στελέχους *L. plantarum* (F_254) πριν και μετά την ενθυλάκωση σε εδώδιμες μεμβράνες με 0% ,5% και 10% BCNW και αποθήκευση στους 5 °C, για 90 ημέρες

Όσον αφορά το βακτηριακό φορτίο των εδώδιμων μεμβρανών, αυτό διατηρήθηκε σε επίπεδα 8,0 log CFU/g στην περίπτωση BCNW 0% και 9,2 log CFU/g στην

περίπτωση BCNW 5% και BCNW 10%, στις 90 ημέρες αποθήκευσής τους στους 5 °C (Γράφημα 4). Η ενθυλάκωση στις εδωδιμες μεμβράνες οδήγησε στη διατήρηση του μικροβιακού πληθυσμού σε επιθυμητά επίπεδα ($>7 \log \text{CFU/g}$) δεδομένου ότι το ελάχιστο φορτίο προβιοτικών κυττάρων πρέπει να είναι $10^6 - 10^7 \text{CFU/g}$ ή mL προϊόντος τη στιγμή της κατανάλωσης, προκειμένου τα προβιοτικά βακτήρια να προσφέρουν τα οφέλη τους στον οργανισμό του ανθρώπου.



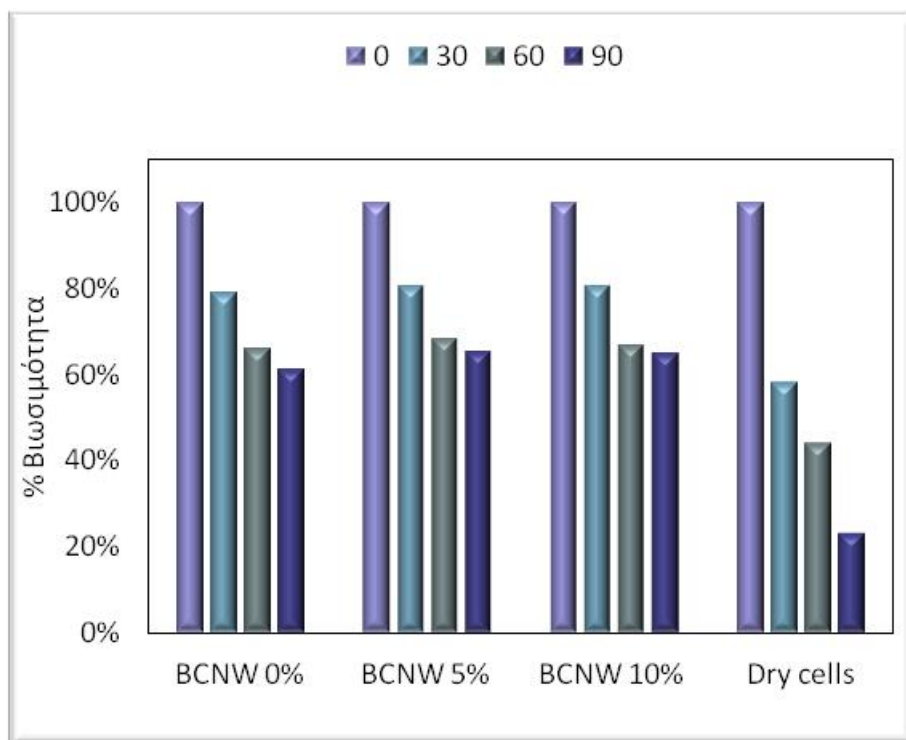
Γράφημα 4.9: Πορεία πληθυσμού του στελέχους *L. plantarum* (F_254) πριν και μετά την ενθυλάκωση σε εδωδιμες μεμβράνες με 0%, 5% και 10% BCNW και αποθήκευση στους 5 °C, για 90 ημέρες

Τα παραπάνω αποτελέσματα κρίνονται αρκετά ικανοποιητικά καθώς σύμφωνα με παρόμοιες έρευνες οι λογάριθμοι του μικροβιακού φορτίου είναι είτε στα ίδια επίπεδα είτε σε υψηλότερα σε σχέση με άλλες μελέτες. Συγκριτικά με την έρευνα των Sanchez-Gonzalez et al. (2013), κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν καζεϊνικό νάτριο 4% (w/w), πρωτεΐνη αρακά 4% (w/w) και υδροξύλιο μεθυλοκυτταρίνης 4% (w/w) ως πολυμερή για την παραγωγή εδωδιμων μεμβρανών, ενθυλακώθηκε και μελετήθηκε η βιωσιμότητα ενός προβιοτικού γαλακτικού βακτηρίου (*L. plantarum*). Η συντήρηση έγινε σε θερμοκρασία 5°C, ενώ ο μικροβιακός πληθυσμός του προβιοτικού παρέμεινε σε ικανοποιητικά επίπεδα ($>6 \log \text{CFU/g}$) για μόλις 28 ημέρες. Επιπρόσθετα, η έρευνα των Kanmani και Lim (2013) χρησιμοποίησε ως πολυμερές για τη παραγωγή

εδώδιμων μεμβρανών με 5-20 g πουλουλάνη με μίγματα αμύλου, ως πρεβιοτικά/πρόσθετα ενώ δεν χρησιμοποίησε κανένα πλαστικοποιητή. Η συντήρησή τους έγινε στους 5°C και το μικροβιακό φορτίο των προβιοτικών (*L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*) που ενθυλακώθηκαν στις εδώδιμες μεμβράνες παρέμεινε σε ικανοποιητικά επίπεδα για δύο μόλις μήνες (>6 log CFU/g). Ακόμη, η έρευνα των Concha-Meyer et al. (2011) ενθυλακώθηκε *Carnobacterium maltaromaticum* σε εδώδιμες μεμβράνες με πλαστικοποιητές και παρόλο που η συντήρηση έγινε σε θερμοκρασία 4 °C, το μικροβιακό φορτίο παρέμεινε σε ικανοποιητικά επίπεδα(>7 log CFU/mL) για 28 ημέρες.

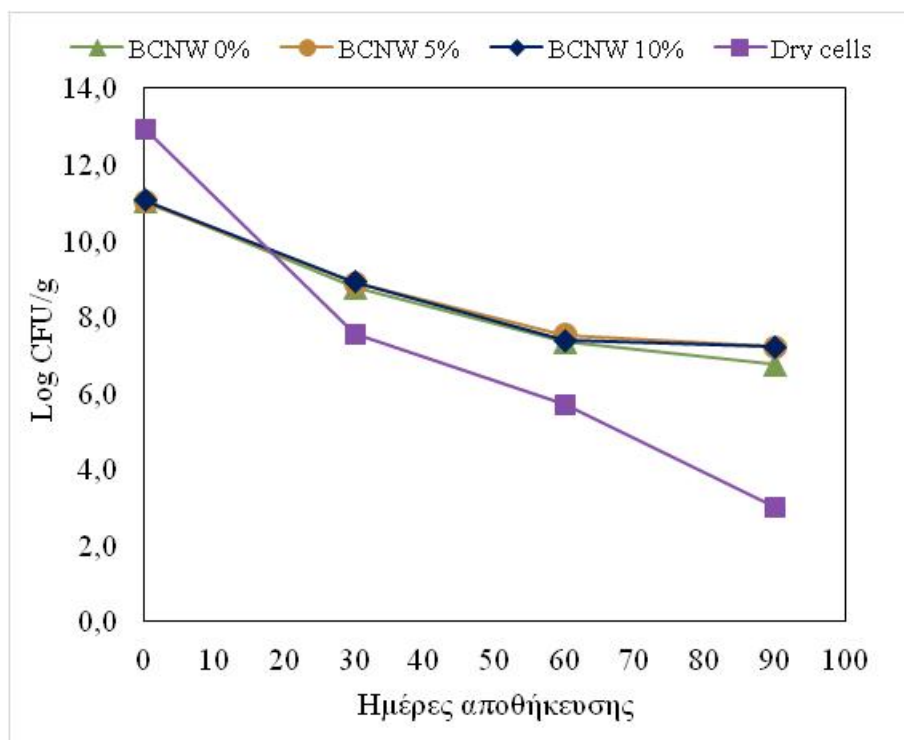
4.4.2 Αποθήκευση στους 25°C

Το πείραμα της ενθυλάκωσης του γαλακτικού βακτηρίου F_254 και η επίδραση της BCNW σε αυτό, παράλληλα πραγματοποιήθηκε και σε αποθήκευσης 25 °C, διατηρώντας όλες τις άλλες παραμέτρους ίδιες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Γράφημα 5, στο οποίο φαίνεται πως η θερμοκρασία 25 °C επηρεάζει τη βιωσιμότητα του F_254, καθώς παρατηρούνται χαμηλότερα ποσοστά συγκριτικά με τα προαναφερόμενα σε θερμοκρασία 5°C. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώνεται ότι η πτώση της βιωσιμότητας γίνεται με γρηγορότερους ρυθμούς από τις πρώτες 30 ημέρες, καταλήγοντας στις 90 ημέρες με βιωσιμότητα 61% στη περίπτωση BCNW 0%, 65% για τις περιπτώσεις BCNW 5% και BCNW 10%, και 23% για τα Dry cells.



Γράφημα 4.10: Έλεγχος της βιωσιμότητας του στελέχους *L. plantarum* (F_254) πριν και μετά την ενθυλάκωση σε εδωδιμες μεμβράνες με 0% ,5% και 10% BCNW και αποθήκευση στους 25 °C, για 90 ημέρες

Σημειώνεται ότι το βακτηριακό φορτίο, αν και χαμηλότερο συγκριτικά με τη προηγούμενη θερμοκρασία που εξετάστηκε (5°C), παραμένει σε επιθυμητά επίπεδα έως και το πέρας των 90 ημερών και στις 3 περιπτώσεις (BCNW 0%, BCNW 5%, BCNW 10%). Εξαίρεση αποτελούν τα Dry cells, τα οποία δεν πληρούν τα απαραίτητα κριτήρια σε καμία από τις συνθήκες αποθήκευσης που μελετήθηκαν.



Γράφημα 4.11 : Πορεία πληθυσμού του στελέχους *L. plantarum* (F_254) πριν και μετά την ενθυλάκωση σε εδωδιμες μεμβράνες με 0% ,5% και 10% BCNW και αποθήκευση στους 25 °C, για 90 ημέρες.

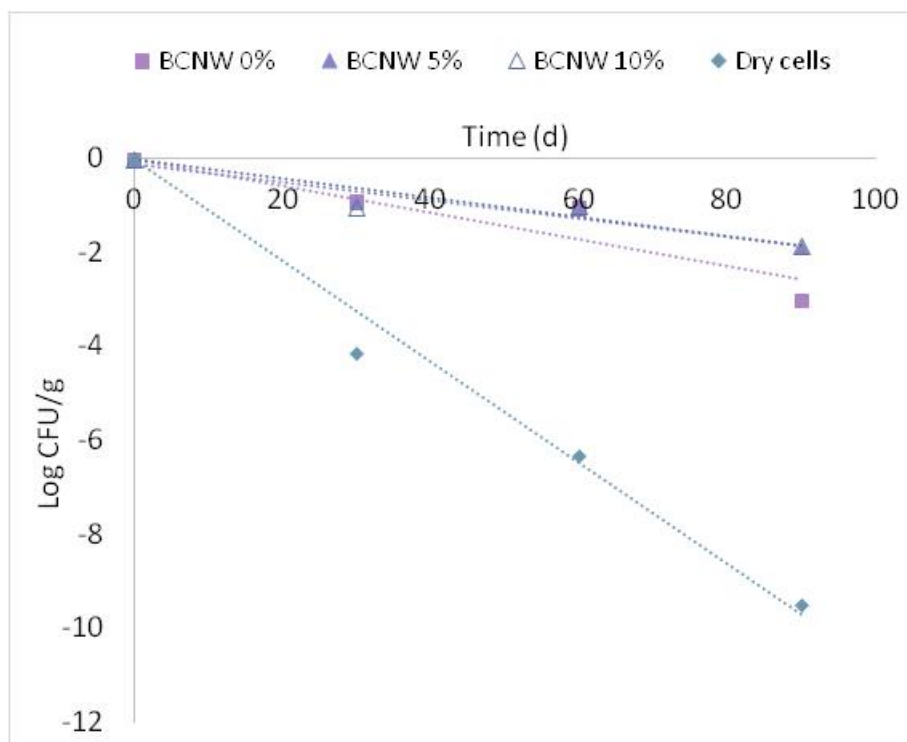
Η έρευνα των Soukoulis et al. (2014) μελέτησε τη βιωσιμότητα ενός προβιοτικού γαλακτικού βακτηρίου (*L. rhamnosus*, GG), μετά από ενθυλάκωση σε εδωδιμες μεμβράνες, για τη παραγωγή των οποίων χρησιμοποιήθηκαν 1% αλγινικό νάτριο και 2% συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Η συντήρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 25°C και ο μικροβιακός πληθυσμός του προβιοτικού παρέμεινε σε ικανοποιητικά επίπεδα (>6 log CFU/g) για μόλις 24 ημέρες. Επιπρόσθετα, η έρευνα των Dianin et al. (2019), έδειξε μικροβιακό φορτίο του ενθυλακωμένου *Lactocaseibacillus casei* 5.70–7.77 log CFU/g στις 28 ημέρες σε συνθήκες συντήρησης 25 °C. Για τη παραγωγή μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε ως πολυμερές 10% w/v πρωτεΐνη ορού γάλακτος και ως πλαστικοποιητής 5% (w/v) γλυκερόλη. Συστατικά τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί και στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα όμως ανεδείχθησαν περισσότερο υποσχόμενα. Ακόμη, (Pereira et al., 2019) ενθυλακώνοντας το προβιοτικό *B. animalis subsp. Lactis* BB-12 σε εδωδιμες μεμβράνες με 10% (w/v) πρωτεΐνη ορού γάλακτος 2% αλγινικό, πλαστικοποιητές 5% (w/w) γλυκερόλη και 12% (w/w) γλυκερόλη και ως πρεβιοτικό/πρόσθετο 2% ινουλίνη, κατάφεραν να διατηρήσουν τη βιωσιμότητα των μεμβρανών σε 7 log CFU/g για 90 ημέρες σε συνθήκες συντήρησης 25°C. Μάλιστα η συγκεκριμένη μελέτη είναι

από τις ελάχιστες περιπτώσεις όπου η διατήρηση της βιωσιμότητας διατηρήθηκε σε εξίσου υψηλά επίπεδα για τις συνθήκες αυτές, με την παρούσα μελέτη.

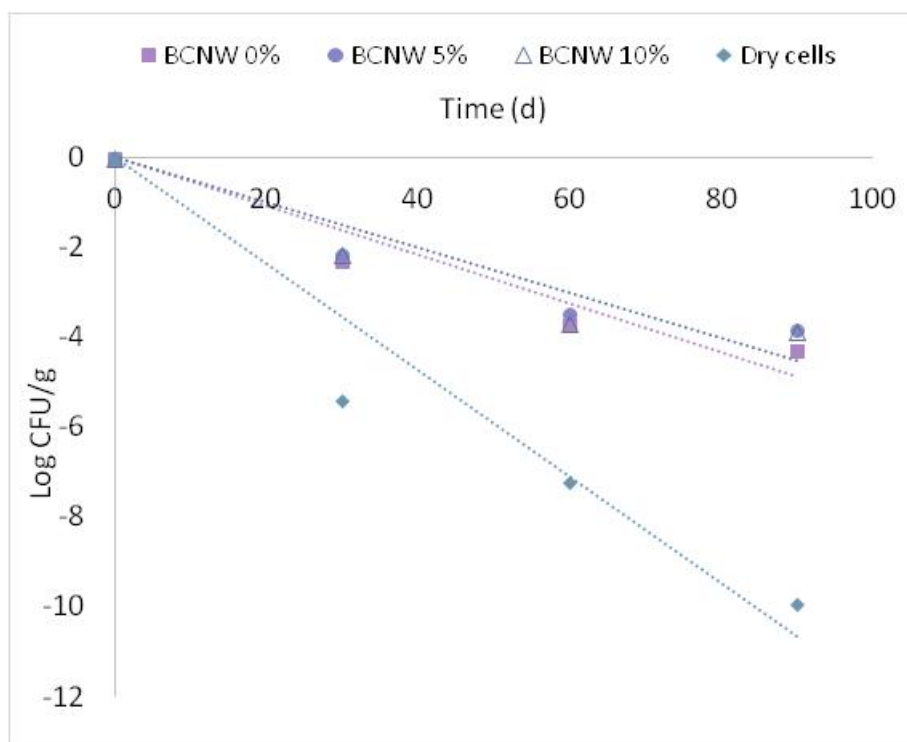
4.5 Συγκριτική αξιολόγηση ρυθμού μείωσης βιωσιμότητας στις διαφορετικές συνθήκες

Στην ενότητα αυτή, παρουσιάζεται η πορεία του μικροβιακού πληθυσμού των εδώδιμων μεμβρανών και η ο ρυθμός με τον οποίο μειώνεται η βιωσιμότητά του κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες ψύξης (5 °C) και θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C). Παράλληλα, με τον ίδιο τρόπο έχει υπολογιστεί και ο ρυθμός μείωσης της βιωσιμότητας και για το μικροοργανισμό ο οποίος έχει αποθηκευτεί στην λυοφιλιωμένη του μορφή χωρίς να δεχθεί περεταίρω ενθυλάκωση. Από τις εξισώσεις που σχηματίστηκαν προέκυψε και η εύρεση του ρυθμού μείωσης του μικροβιακού πληθυσμού του στελέχους για κάθε περίπτωση ξεχωριστά, ο οποίος και αναφέρεται στον Πίνακα 1.

Αναφορικά, με το Γράφημα 7, το οποίο αναφέρεται στη μείωση της βιωσιμότητας κατά την αποθήκευση των μεμβρανών και των Dry cells τόσο στους 5 °C αλλά και στους 25 °C, ο ρυθμός μείωσης της βιωσιμότητας του στελέχους στην περίπτωση των Dry cells ($0,110/0,120 \frac{\log cfu/g}{d}$) είναι σχεδόν ο διπλάσιος σε σχέση με την περίπτωση όπου το στέλεχος έχει ενθυλακωθεί στις εδώδιμες μεμβράνες από πρωτεΐνη τυρογάλακτος (0,030/ 0,055). Επιπλέον, η προσθήκη της BCNW φαίνεται να συμβάλει θετικά στη μείωση του ρυθμού μείωσης του πληθυσμού στην περίπτωση BCNW 5% και στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης. Τέλος, όπως φαίνεται και από τον παρακάτω πίνακα αλλά και τα Γραφήματα 7 και 8 η προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης BCNW BCNW10% δεν φάνηκε να ωφελεί περισσότερο στη διατήρηση του μικροβιακού πληθυσμού, και αυτό επιβεβαιώνεται από τον ρυθμό με τον οποίο μειώνεται η βιωσιμότητα ο οποίος είναι ο ίδιος με την περίπτωση BCNW 5% και στις δύο περιπτώσεις αποθήκευσης.



Γράφημα 4.12 : Ρυθμός μείωσης του μικροβιακού πληθυσμού του στελέχους *L. plantarum* (F_254) πριν και μετά την ενθυλάκωση σε εδωδιμες μεμβράνες με 0% ,5% και 10% BCNW κατά την αποθήκευσή τους στους 5 °C, για 90 ημέρες.



Γράφημα 4.13: Ρυθμός μείωσης του μικροβιακού πληθυσμού του στελέχους *L. plantarum* (F_254) πριν και μετά την ενθυλάκωση σε εδωδιμες μεμβράνες με 0% ,5% και 10% BCNW κατά την αποθήκευσή τους στους 25 °C, για 90 ημέρες

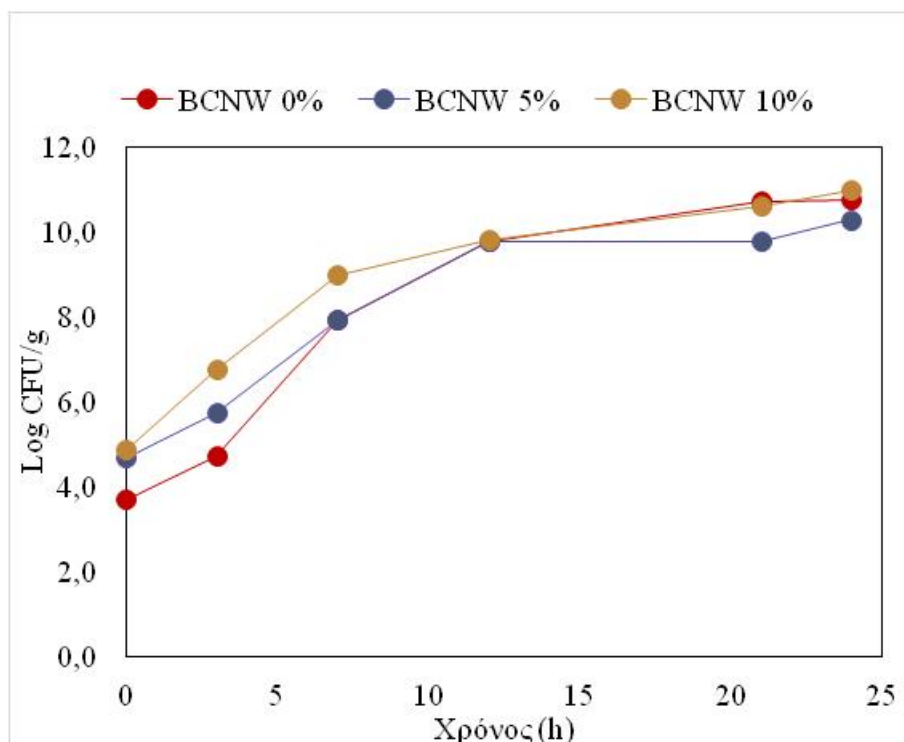
Πίνακας 1: Ρυθμός μείωσης βιωσιμότητας του *L. plantarum* F_254

	T (°C)	k	R²
BCNW 0%	5	0,030	0,900
	25	0,055	0,900
BCNW 5%	5	0,020	0,900
	25	0,050	0,900
BCNW 10%	5	0,020	0,900
	25	0,050	0,900
Dry cells	5	0,110	0,980
	25	0,120	0,980

4.6 Απελευθέρωση γαλακτικών βακτηρίων σε διαλύματα προσομοίωσης τροφίμων

Προσομοιωτές τροφίμων (Food Simulants) χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της μετανάστευσης συστατικών από υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έρθουν σε επαφή με τρόφιμα. Στη παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν δύο υδατικά διαλύματα προσομοίωσης τροφίμων. Εκ των οποίων το ένα είναι το νερό και το δεύτερο το υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 3% (v/v). Τα τρία είδη μεμβρανών (BCNW 0%, 5% και 10%) εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να απελευθερώνουν τα ενθυλακωμένα βακτήρια F_254 κατά τη διάρκεια της επαφής του με τα υδατικά διαλύματα.

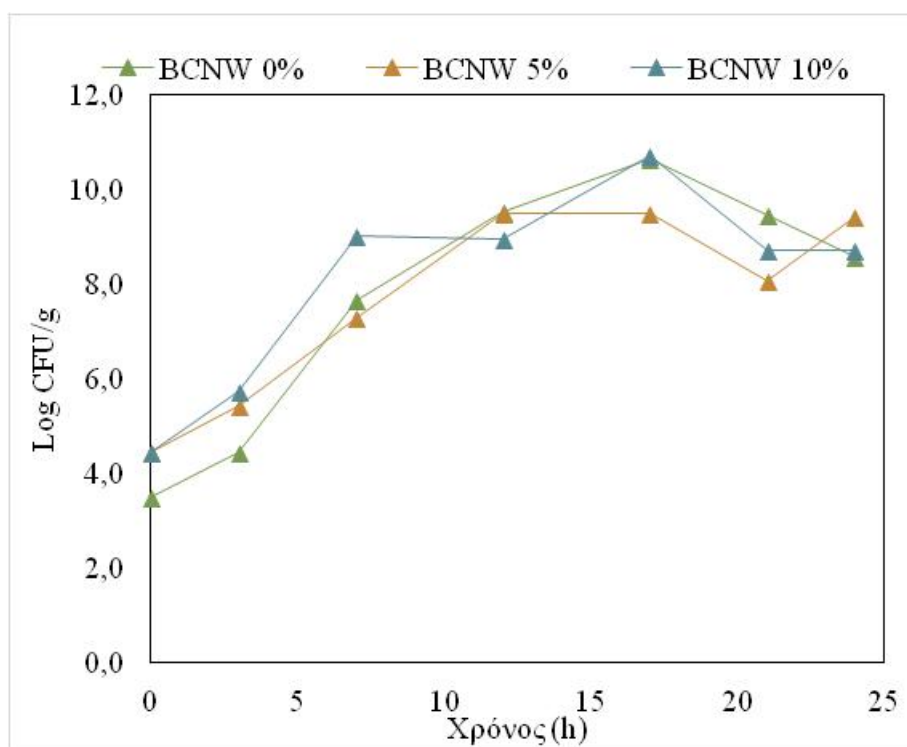
Στο διάλυμα νερού (Γράφημα 4.14), το οποίο παρομοιάζει τις συνθήκες σε ένα τρόφιμο με υψηλή υγρασία, παρατηρήθηκε ότι ο μικροβιακός πληθυσμός αυξανόταν με ταχύ ρυθμό έως και τη χρονική στιγμή T12 και για τις τρεις περιπτώσεις. Μάλιστα, παρατηρείτε σημείο τομής του μικροβιακού πληθυσμού τη χρονική στιγμή T12 (9,8 log CFU/g). Στη συνέχεια, η περίπτωση της BCNW 0% και της BCNW 10% ακολουθούν σχεδόν όμοια πορεία μέχρι και το τέλος του πειράματος (T24), ενώ στη περίπτωση BCNW 5% φαίνεται το μικροβιακό φορτίο να παραμένει σταθερό έως τη χρονική στιγμή T21, μετά από την οποία αυξάνεται 0,5 log CFU/g.



Γράφημα 4.14: Πορεία μικροβιακού πληθυσμού του στελέχους *L. plantarum* (F_254), ενθουλακωμένο σε εδωδιμες μεμβράνες με προσθήκη 0% ,5% και 10% βακτηριακής κυτταρίνης, σε υδατικό διάλυμα προσομοιωτή τροφίμου με υψηλή υγρασία

Στο υδατικό διάλυμα οξικού οξέος (Γράφημα 4.15), το οποίο προσομοιάζει τρόφιμα με υδρόφιλο και όξινο χαρακτήρα, το υψηλότερο μικροβιακό φορτίο παρατηρείται στη περίπτωση BCNW 10% (10,7 log CFU/g) και BCNW 0% (10,6 log CFU/g) τη χρονική στιγμή T17. Ακολουθεί πτώση και για τις δυο περιπτώσεις (8,7 log CFU/g BCNW 10% και 8,6 log CFU/g BCNW 0%). Στη περίπτωση BCNW 5% φαίνεται ότι η υψηλότερη κορυφή είναι αυτή τη χρονική στιγμή T12 (9,5 log CFU/g), ενώ ακολουθεί πτώση (8,1 log CFU/g) και στη συνέχεια αύξηση (9,4 log CFU/g).

Συνοψίζοντας, παρατηρείται ότι οι μεμβράνες που εμπεριέχουν BCNW παρουσιάζουν μεγαλύτερη απελευθέρωση κυττάρων κατά τη χρονική στιγμή T0, γεγονός το οποίο συνάδει με τα αποτελέσματα της διαπερατότητας υδρατμών που συνηγορούν ότι βασικές δομικές αλλαγές έχουν προκληθεί στη μεμβράνη. Ειδικότερα, η ταυτόχρονη προσθήκη λυοφιλιωμένων κυττάρων και BCNW πιθανότατα να έχει δημιουργήσει αλλαγές, όπως μεγαλύτερο πορώδες στην επιφάνεια της μεμβράνης οδηγώντας έτσι σε μεγαλύτερη απελευθέρωση των κυττάρων και των υδρατμών. Παρόμοια συμπεράσματα έχουν αναφερθεί για τις συγκεκριμένες μεμβράνες κατά την ταυτόχρονη προσθήκη BCNW και αιθέριου ελαίου ρίγανης (Papadaki et al., 2024).



Γράφημα 4.15: Μικροβιακός πληθυσμός του στελέχους *L. plantarum* (F_254), σε εδώδιμες μεμβράνες με προσθήκη 0% ,5% και 10% BCNW σε προσομοιωτή τροφίμου με υδρόφιλο και όξινο χαρακτήρα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα έρευνα, μελετήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης εδώδιμων μεμβρανών με βιολειτουργικές ιδιότητες μέσω της ενσωμάτωσης γαλακτικού βακτηρίου που εμφανίζει, σε προκαταρκτική *in vitro* μελέτη που έχει κάνει το εργαστήριο Χημείας Τροφίμων και Βιομηχανικών Ζυμώσεων, ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου. Στο πλαίσιο αυτό, αξιοποιήθηκε πλήρως το τυρόγαλα, κι ειδικότερα η λακτόζη του τυρογάλακτος αξιοποιήθηκε για την παραγωγή κυττάρων *L. plantarum* F_254 μέσω ζύμωσης, ενώ η συμπυκνωμένη πρωτεΐνη του τυρογάλακτος χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ανάπτυξη των εδώδιμων μεμβρανών. Αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε η πιθανή χρήση των εδώδιμων μεμβρανών ως προστατευτικοί φορείς εγκλωβισμού του γαλακτικού βακτηρίου F_254 και η επίδραση στη βιωσιμότητά του υπό διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Επιπρόσθετα αυτών, μελετήθηκε και η διαφοροποίηση της μήτρας εγκλωβισμού, δηλαδή η προσθήκη βακτηριακής νανοκυτταρίνης (BCNW) στην εδώδιμη μεμβράνη, και η επίδρασή της στη βιωσιμότητα του γαλακτικού βακτηρίου. Ειδικότερα, από τα αποτελέσματα της μελέτης διεξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- ✓ Το καταλληλότερο κρυοπροστατευτικό υλικό για την παραγωγή λυοφιλωμένων κυττάρων ήταν το αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα, καθώς με τη προσθήκη του, η βιωσιμότητα διατηρήθηκε 85%.
- ✓ Η προσθήκη BCNW επιδρά στις φυσικές ιδιότητες των εδώδιμων μεμβρανών, και σε κάποιες περιπτώσεις υπάρχουν διαφοροποιήσεις ανάλογα τη συγκέντρωσή της.
- ✓ Η βιωσιμότητα του εγκλωβισμένου F_254 κατά την αποθήκευση στους 5 °C ήταν 47% υψηλότερη σε σχέση με τα μη εγκλωβισμένα λυοφιλωμένα κύτταρα, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ενθυλάκωση σε εδώδιμες μεμβράνες μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στη διατήρηση της βιωσιμότητας.
- ✓ Το μεγαλύτερο ποσοστό βιωσιμότητας του F_254 παρατηρήθηκε στις μεμβράνες που περιείχαν BCNW και ήταν ανεξάρτητο της συγκέντρωσής της.

- ✓ Σε ό,τι αφορά την θερμοκρασία αποθήκευσης στις 90 ημέρες, το υψηλότερο ποσοστό βιωσιμότητας ήταν 83% (9log CFU/g) στους 5 °C, ενώ ήταν 18% χαμηλότερη στους 25 °C (μεμβράνες που περιείχαν BCNW).
- ✓ Η μελέτη απελευθέρωσης του γαλακτικού βακτηρίου σε διαλύματα προσομοίωσης τροφίμων έδειξε ότι το υψηλότερο ποσοστό απελευθέρωσης παρατηρούνταν στις μεμβράνες με BCNW 10%. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις υπήρχε πλήρης απελευθέρωση έως το τέλος της κινητικής μελέτης.

Συνοψίζοντας, οι εδώδιμες μεμβράνες μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στη διατήρηση της βιωσιμότητας του στελέχους F_254, ενώ καθοριστικό και συνεργιστικό ρόλο διαδραματίζουν τα υλικά/μήτρα των εδώδιμων μεμβρανών και οι συνθήκες αποθήκευσής τους.

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Αγγελής, Γ.,2017. Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία. Unibooks, Αθήνα.
- Σφλώμος, Κ.,2019. Βιολειτουργικά τρόφιμα, πρόσθετα & συμπληρώματα διατροφής. Τσότρας,2019.

Διεθνής Βιβλιογραφία

- Amirania, E., Milajerdi, A., Mirzaei, H., Jamili, H., Mansournia, M.A., Hallajzadeh, J., Ghaderi, A. The effects of probiotic supplementation on mental health, biomarkers of inflammation and oxidative stress in patients with psychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complementary Therapies in Medicine* 49 (2020) 102361
- Anal, A.K.; Singh, H, 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology* 18:240-251
- Björkroth, J., Koort, J., 2016. Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity. Reference Module in Food Science. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Bodzen, A., Jossier, A., Dupont, S., Mousset, P.Y., Beney, L., Lafay, S., Gervais, P. Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried *Lactobacillus* strain survival to long-term storage. *BMC Biotechnology* (2021) 21:66
- COMMISSION REGULATION (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food
- Concha-Meyer, A., Schobitz, R., Brito, C. & Fuentes, R. (2011). ϵ Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control*, 22, 485–489

Dianin, I., Oliveira, J.A., Pimentel, T., Hernandes, N. & Costa, G. (2019). Edible biofilms formulated with whey proteins isolate and *Lactobacillus casei* probiotic culture: characterization and application in tomatoes or grapes. *Chemical Engineering Transactions*, 75, 469–474

El Far, M.S.; Zakaria, A.S.; Kassem, M.A.; Wedn,A.; Guimei, M.; Edward, E.A. Promising biotherapeutic prospects of different probiotics and their derived postbiotic metabolites: in-vitro and histopathological investigation. El Far et al. *BMC Microbiology* 2023

FAO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Report of a Joint FAO; FAO: Rome, Italy, 2006.

Fijałkowski, K.; Peitler, D.; Rakoczy, R.; Zywicka, A. Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution. *LWT - Food Science and Technology* 68 (2016) 322-328
Galus, S., Kadzinska, J. 2016. Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 78–86

Gialamas, H., Zinoviadou, K.G., Biliaderis, C.G. & Koutsoumanis, K.P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus Sakai* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43, 2402–2408

Gonçalves, R.F.S.; Vicente, A.A.; Pinheiro, A.C. Incorporation of curcumin-loaded lipid-based nano delivery systems into food: Release behavior in food simulants and a case study of application in a beverage. *Food Chemistry* 405 (2023) 134740

Haji ,F.; Cheon, J.; , Baek, J.; Wang, Q.; Chiu Tam, K. Application of Pickering emulsions in probiotic encapsulation- A review. *Current Research in Food Science* 5 (2022) 1603–1615

Iskandar, C.F., Cailliez-Grimal .C., Borges, F., Revol-Junelles, A.M.,2019. Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation. Trends in Food Science & Technology 88:121–132

Kanmani, P., Lim, S. 2013. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. Food Chemistry, 141, 1041–1049

Keresztény, T.; Libisch, B.; Orbe, S.C.; Nagy, T.; Kerényi, Z.; Kocsis, R.; Posta, K.; Papp, P.P.; Olasz, F, 2023. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria With Probiotic Attributes From Different Parts of the Gastrointestinal Tract of Free-living Wild Boars in Hungary. Probiotics and Antimicrobial Proteins

Lappa, I.K.; Papadaki, A.; Kachrimanidou, V.; Terpou, A.; Koulougliotis, D.; Eriotou, E.; Kopsahelis, N. Cheese whey processing: Integrated biorefinery concepts and emerging food applications. Foods 2019, 8, 347

Lappa,I.K.; Kachrimanidou,V.; Papadaki,A.; Stamatiou,A.; Ladakis,D.; Eriotou,E.; Kopsahelis,N. A Comprehensive Bioprocessing Approach to Foster Cheese Whey Valorization: On-Site β -Galactosidase Secretion for Lactose Hydrolysis and Sequential Bacterial Cellulose Production. Fermentation 2021, 7, 184

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2021. Βιολογία των μικροοργανισμών. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

Mohammady, M., Mohammadi, Y., Yousefi, G. Freeze-Drying of Pharmaceutical and Nutraceutical Nanoparticles: The Effects of Formulation and Technique Parameters on Nanoparticles Characteristics. Journal of Pharmaceutical Sciences 109 (2020) 3235-3247

Muhoza, B.; Yuyang, H.; Uriho, A.; Harindintwali, Liu, Q.; Li, Y. Spray-and freeze-drying of microcapsules prepared by complex coacervation method: A review. Food Hydrocolloids 140 (2023) 108650

Oliveira-Alcântaraa, A.V., Abreub, A.A.S. , Gonçalvesc,C. , Fuciñosc,P., Cerqueirac,M.A., Gamad,F.M.P., Pastranac, L.M., Rodriguesb, S., Azeredo, H.M.C.

Bacterial cellulose/cashew gum films as probiotic carriers. *LWT - Food Science and Technology* 130 (2020) 109699

Papadaki, A.; Manikas, A.C.; Papazoglou, E.; Kachrimanidou, V.; Lappa, I.; Galiotis, C.; Mandala, I.; Kopsahelis, N. Whey protein films reinforced with bacterial cellulose nanowhiskers: Improving edible film properties via a circular economy approach. *Food Chemistry* 385 (2022) 132604

Papadaki, A.; Lappa, I.; Manikas, A.C.; Carbone, M. G. P; Natsia. A.; Kachrimanidou, V.; Kopsahelis, N. Grafting bacterial cellulose nanowhiskers into whey protein/essential oil film composites: Effect on structure, essential oil release and antibacterial properties of films. *Food Hydrocolloids* 147 (2024) 109374

Pereira, E.P.R.; da Graça, J.S.; Ferreira, B.M.; Balthazar, C.F.; Santos, D.X.; Bezerril, F.F.; Magnani, M.; Sant'Ana, A.S, 2024. What are the main obstacles to turning foods healthier through probiotics incorporation? a review of functionalization of foods by probiotics and bioactive metabolites. *Food Research International* 176 (2024) 113785

Saleena, L.A.K.; Kumaran, D.; How, Y.H.; Pui, L.P. Probiotic-edible film in active packaging with antimicrobial effect and storage viability: a review. *International Journal of Food Science and Technology* 2023

Samananda Singh, L. Nano-emulsion encapsulation for the efficient delivery of bacteriophage therapeutics. *Biologicals* 85 (2024) 101725

Sanchez-Gonzalez, L., Quintero, S.J.I. & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloid*, 33, 92–98

Sornplang, P.; Piyadeatsoontorn, S. Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of Animal Science and Technology* (2016) 58:26 DOI 10.1186/s40781-016-0108-2

Soukoulis, C.; Jobbehda, S.B., Macnaughtan, W.; Parmenter, C.; Fisk, I.D. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated in edible films: Impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate. *Food Hydrocolloids* 70 (2017) 345e355

Soukoulis, C.; Yonekura, L.; Gan, H.H.; Jobbehdar, S.B.; Parmenter, C.; Fisk, I. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids* 39 (2014) 231-242

Terpou,A.; Papadaki,A. Lappa, I.K.;Kachrimanidou,V.; Loulouda A. Bosnea,L.A.; Kopsahelis,N. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients* 2019, 11, 1591